

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MECANISMOS DE MANTENIMIENTO DEL MEDIO
INTERNO EN RESPUESTA A ESTRÉS AMBIENTAL EN
CRUSTÁCEOS DECÁPODOS DE INTERÉS REGIONAL**

Autora: *Silvina Andrea Pinoni*

Directora: *Dra. Alejandra A. López Mañanes*

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS –

ÁREA BIOLOGÍA

Año 2009

Parte de los resultados de la presente Tesis han sido publicados. Como reconocimiento y agradecimiento a los co-autores de estos trabajos se detallan a continuación las citas correspondientes:

Pinoni, S.A., Goldemberg, A.L., López Mañanes, A.A. 2005. "Alkaline Phosphatase activities in muscle of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*: response to environmental salinity." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326: 217-226.

Pinoni, S.A., López Mañanes, A.A. 2008. "Partial characterization and response upon hyperegulating conditions of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase and levamisole-sensitive Alkaline Phosphatase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*." *Scientia Marina*, 72: 15-24.

Pinoni, S.A., López Mañanes, A.A. 2009. " Na^+ ATPase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: differential response to environmental salinity." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 372: 91-97.

RESUMEN

Mecanismos de mantenimiento del medio interno en respuesta a estrés ambiental en crustáceos decápodos de interés regional

Silvina Andrea Pinoni

El objetivo general fue realizar estudios de caracterización y regulación por factores ambientales e intrínsecos de distintas actividades enzimáticas en músculo y hepatopáncreas de los cangrejos eurihalinos *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). Para cumplir con el objetivo se llevaron a cabo estudios de caracterización y/o respuesta a factores ambientales sobre las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasas en músculo de *N. granulata* (Capítulo 1, 3 y 5); estudios de caracterización y respuesta a factores ambientales e intrínsecos sobre las actividades de fosfatasa alcalina (AP) en músculo de *N. granulata* (Capítulos 2, 3 y 5) y *C. angulatus* (Capítulo 6); localización y respuesta a salinidad reducida sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 4) y *C. angulatus* (Capítulo 7). Los resultados muestran la presencia en músculo de *N. granulata* de dos actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína (insensible y sensible a furosemida), coexistentes con la Na^+/K^+ ATPasa, con respuesta diferencial a la hiperregulación y emersión. Se demostró la existencia de dos actividades de AP en músculo y hepatopáncreas de ambos cangrejos (insensible y sensible a levamisol), con diferentes características bioquímicas y respuesta a salinidad reducida. Se encontraron diferencias en la regulación de las actividades de AP en músculo de *N. granulata* por emersión y GMP_c . Se demostró la presencia de actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus*, las cuales fueron afectadas por la salinidad ambiental, y por la emersión en *N. granulata*. Estos resultados sugieren el rol diferencial de estas actividades enzimáticas, y del músculo y hepatopáncreas frente a cambios en las condiciones ambientales en estos cangrejos.

ABSTRACT

Mechanisms of Maintenance of the Internal Medium of Decapod Crustaceans of Regional Interest in Response to Environmental Stress

Silvina Andrea Pinoni

The general aim was to determine characteristics and regulation by environmental of different enzymatic activities in muscle and hepatopancreas from euryhaline crabs *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina). To achieve this aim, studies of characterization and/or response to environmental factors of Na^+/K^+ ATPase and Na^+ ATPases in muscle of *N. granulata* (Chapters 1, 3 and 5), studies of characterizations and response to environmental and intrinsic factors on alkaline phosphatase (AP) activities of muscle of *N. granulata* (Chapters 2, 3 and 5) and *C. angulatus* (Chapter 7) were carried out. The results show the occurrence of two ouabain-insensitive Na^+ ATPases (furosemide-sensitive and furosemide-insensitive) activities in muscle of *N. granulata* coexistent with Na^+/K^+ ATPase, with differential responses to salinity and emersion. Muscle and hepatopancreas exhibited levamisol-insensitive and levamisol-sensitive AP activities with distinct biochemical characteristics and response to reduced salinity. These activities were differentially affected in muscle of *N. granulata* by emersion and GMP_c . Proteolytic activity occurred in hepatopancreas of *N. granulata* and *C. angulatus*. This activity was affected by environmental salinity in both crabs and by emersion in *N. granulata*. These results suggest the differential role of these enzymatic activities, and of muscle and hepatopancreas, of these crabs in biochemical adjustments upon changes in environmental conditions.

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO 1: Actividad Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína en músculo de la quela de <i>Neohelice granulata</i>.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Productos químicos	11
Captura y mantenimiento de los animales.....	12
Preparación de extractos enzimáticos.....	12
Determinación de la actividad Na ⁺ ATPasa.....	13
Determinación de la concentración de proteínas.....	14
Análisis de resultados experimentales.....	14
RESULTADOS.....	15
Efecto del Na ⁺ sobre la actividad Na ⁺ ATPasa en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	15
Efecto de furosemida sobre la actividad Na ⁺ ATPasa en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	16
Efecto de concentraciones crecientes de ATP sobre las actividades Na ⁺ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	18
Efecto del pH sobre las actividades Na ⁺ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	20
DISCUSIÓN.....	20

CAPÍTULO 2: Actividades de fosfatasa alcalina en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	
<i>N. granulata</i>	23
INTRODUCCIÓN	24
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Productos químicos	27
Captura y mantenimiento de los animales.....	27
Preparación de extractos enzimáticos.....	28
Determinación de la actividad de AP.....	28
Determinación de la concentración de proteínas.....	29
Análisis de resultados experimentales.....	29
RESULTADOS	30
Actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i> :	
efecto del pH, levamisol y aminoácidos.....	30
Efecto del pNPP sobre las actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	34
Efecto de la temperatura sobre las actividades de AP	
en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	36
Efecto del Cu ²⁺ sobre las actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	37
DISCUSIÓN	38
CAPÍTULO 3: Respuestas a salinidad ambiental de actividades	
Na⁺ ATPasas y de fosfatasa alcalina en músculo de la quela	
de <i>N. granulata</i>	41
INTRODUCCIÓN	42
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Productos químicos	47

Captura y mantenimiento de los animales.....	47
Preparación de extractos enzimáticos.....	48
Determinación de la actividad Na^+ ATPasa	48
Determinación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa.....	49
Determinación de la actividad de AP.....	49
Determinación de la concentración de proteínas.....	50
Determinación de osmolalidad y concentraciones de iones en hemolinfa.....	50
Estudios “in vitro” de mensajeros químicos sobre las actividades de AP en músculo.....	50
Análisis de resultados experimentales.....	51
RESULTADOS.....	52
Efecto de la salinidad sobre las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	52
Efecto de la salinidad sobre las actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	53
Efecto de un cambio abrupto a salinidad ambiental reducida sobre las actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	55
Efecto de un cambio abrupto a salinidad ambiental reducida sobre las concentraciones de iones en hemolinfa de <i>N. granulata</i>	56
Estudios sobre el efecto <i>in vitro</i> de mensajeros químicos intracelulares sobre las actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	58
DISCUSIÓN.....	60
CAPÍTULO 4: Actividades de fosfatasa alcalina y proteolítica en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>: respuestas a salinidad	66
INTRODUCCIÓN.....	67
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71

Productos químicos	71
Captura y mantenimiento de los animales.....	72
Preparación de extractos enzimáticos.....	72
Determinación de la actividad de AP.....	73
Determinación de la actividad proteolítica.....	74
Preparación de extractos de branquias.....	74
Preparación de extractos de músculo.....	75
Determinación de la concentración de proteínas.....	75
Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa.....	75
Determinación de de glucógeno en branquias	76
Análisis de resultados experimentales.....	76
RESULTADOS.....	76
Actividad de AP en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> : respuesta a pH y levamisol.....	76
Actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> expuestos a diferentes condiciones de salinidad ambiental.....	79
Efecto de la exposición a baja salinidad sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> a distintos tiempos luego de la ingesta	81
DISCUSIÓN.....	89
CAPÍTULO 5: Respuestas a emersión en músculo de la quela y hepatopáncreas de <i>N. granulata</i>.....	96
INTRODUCCIÓN.....	97
MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
Productos químicos	99
Captura y mantenimiento de los animales.....	100
Preparación de extractos enzimáticos.....	100

Determinación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa.....	100
Determinación de la actividad Na^+ ATPasa	101
Determinación de la actividad de AP en músculo	101
Determinación de la actividad de AP y proteolítica en hepatopáncreas.	101
Determinación de la concentración de proteínas.....	101
Determinación de las concentraciones de iones en hemolinfa.....	101
Análisis de resultados experimentales.....	102
RESULTADOS.....	102
Efecto de la emersión sobre las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de <i>N. granulata</i>	102
Actividades de AP en músculo de la quela de <i>N. granulata</i> expuestos a emersión.....	104
Efecto de la emersión sobre concentraciones iónicas en hemolinfa.....	105
Actividades de AP en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> en condiciones de emersión.....	105
Efecto de la emersión sobre la actividad proteolítica en hepatopáncreas de <i>N. granulata</i> ...	107
DISCUSIÓN.....	108
CAPÍTULO 6: Caracterización parcial y respuesta a salinidad	
de actividades de fosfatasa alcalina en músculo de la quela de	
<i>Cyrtograpsus angulatus</i>.....	112
INTRODUCCIÓN.....	113
MATERIALES Y MÉTODOS.....	115
Productos químicos	115
Captura y mantenimiento de los animales.....	116
Preparación de extractos enzimáticos.....	116
Determinación de la actividad de AP.....	117
Estudios <i>in vitro</i> de mensajeros químicos sobre las actividades de AP en músculo.....	118

Determinación de las concentraciones iónicas en hemolinfa.....	118
Análisis de resultados experimentales.....	118
RESULTADOS.....	119
Actividades de AP en músculo de la quela de <i>C. angulatus</i> : efecto del pH y levamisol...119	
Efecto del pNPP sobre las actividades de AP en músculo de la quela de <i>C. angulatus</i>121	
Efecto de la temperatura sobre las actividades de AP	
en músculo de la quela de <i>C. angulatus</i>	123
Efecto de la salinidad ambiental sobre las actividades de AP en músculo	
de la quela de <i>C. angulatus</i>	124
Actividades de AP en músculo de la quela de <i>C. angulatus</i> en presencia de DA <i>in vitro</i> ...125	
DISCUSIÓN.....	125
CAPÍTULO 7: Actividades de fosfatasa alcalina y actividad proteolítica	
en hepatopáncreas de <i>Cyrtograpsus angulatus</i>: respuesta a salinidad	130
INTRODUCCIÓN.....	131
MATERIALES Y MÉTODOS.....	133
Productos químicos	133
Captura y mantenimiento de los animales.....	133
Preparación de extractos enzimáticos.....	133
Determinación de la actividad de AP.....	134
Determinación de la actividad proteolítica.....	134
Determinación de la concentración de proteínas.....	134
Análisis de resultados experimentales.....	135
RESULTADOS.....	135
Actividad de AP en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i> : respuesta a pH y levamisol.....	135
Actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i> expuestos a	

diferentes condiciones de salinidad ambiental.....	138
Actividad proteolítica en hepatopáncreas de <i>C. angulatus</i> expuestos a diferentes condiciones de salinidad ambiental.....	140
DISCUSIÓN.....	141
DISCUSIÓN GENERAL.....	145
CONCLUSIÓN.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	150

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

La flexibilidad fenotípica involucra variaciones reversibles, dentro de un individuo, en respuesta a cambios espacio-temporales en las condiciones ambientales (Piersma y Drent, 2003). Las variaciones en las condiciones externas (factores bióticos y abióticos) pueden disparar mecanismos de ajuste a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico y/o comportamental (Kirschner, 1991, 2004; Bozinovic, 2003). Estas respuestas parecen ser dependientes de la especie, hábitat y tipo de estrés y no siempre se producen en forma conjunta.

Los cangrejos eurihalinos que habitan zonas con una variación espacio-temporal marcada en la salinidad ambiental (zonas de mareas, aguas costeras y estuarios) (Chapman y Wang, 2001; Brockway et al., 2006) presentan adaptaciones a distintos niveles (bioquímico, fisiológico, morfológico y/o de comportamiento) que les permiten soportar un amplio rango de variación en la salinidad ambiental (Kirschner, 1991; 2004). El rango de eurihalinidad depende de la capacidad de osmoionorregular, o sea, la habilidad de mantener un gradiente entre las concentraciones iónicas y osmóticas de la hemolinfa y la del medio externo (Kirschner, 2004).

En salinidad reducida, los cangrejos hiperreguladores (que son capaces de mantener la osmolalidad de la hemolinfa por encima de la del medio externo) absorben activamente Na^+ y Cl^- desde el medio externo a través de las branquias para compensar la pérdida de sales (Lucu and Towle, 2003; Kirschner, 2004). Debido a la importancia del proceso hiperregulatorio en la supervivencia e historia de vida de cangrejos eurihalinos se han realizado diversos estudios para determinar los componentes, a distintos niveles, implicados en el transporte activo de iones en branquias, mantenimiento del equilibrio ácido-base y mecanismos de regulación del volumen celular (revisión en Lucu y Towle, 2003; Kirschner, 2004; Bianchini et al., 2008). En

este contexto, los estudios sobre mecanismos de ajuste a nivel bioquímico se han centrado principalmente en los cambios en la actividad y/o expresión de distintos sistemas de transporte y actividades enzimáticas en branquias en respuesta a la exposición a salinidad reducida (revisión en Lucu y Towle, 2003; Kirschner, 2004) (Lovett et al 2006; Tsai and Lin, 2007; Lucu et al. 2008). Así, ha sido ampliamente establecido que las branquias posteriores constituyen el principal sitio del transporte activo de iones relacionado a la hiperregulación y que la Na^+/K^+ ATPasa branquial constituye un componente central a nivel bioquímico en este proceso (revisión en Lucu y Towle, 2003; Kirschner, 2004). Sin embargo, los mecanismos de ajuste en otros órganos y tejidos de cangrejos eurihalinos, particularmente a nivel bioquímico, en respuesta a la salinidad ambiental son poco conocidos. En varias especies se ha sugerido el rol del músculo y del hepatopáncreas en mecanismos de ajuste secundarios a la osmoionorregulación (Ahearn et al, 1999; Holt y Kinsey, 2002; Luvizotto-Santos et al, 2003; Jahn et al., 2006). Así, el músculo de cangrejos eurihalinos ha sido involucrado en la regulación de volumen celular (Lang y Gaener, 1969; Moran y Pierce, 1984), balance ácido-base (Whiteley et al., 2001) y en la movilización de lípidos (Luvizotto-Santos et al., 2003) bajo estrés hipoosmótico. Sin embargo, faltan estudios sobre la respuesta de enzimas clave (ej. ATPasas, fosfatasa alcalinas) posiblemente involucradas en estos procesos.

La hiperregulación es un proceso fisiológico con alto costo energético. Se requiere de una reorganización metabólica para soportar las demandas aumentadas de energía asociadas con la activación de la maquinaria osmoionorregulatoria. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los ajustes digestivos y metabólicos que permitirían soportar la demanda incrementada de energía bajo condiciones de hiperregulación. Así, faltan estudios sobre enzimas del tracto digestivo (por ejemplo a nivel de actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas) y la posible modulación diferencial de las mismas que permitiría ajustes en la eficiencia digestiva y de esta manera en el presupuesto energético para soportar la hiperregulación.

Neohelice (Chasmagnathus) granulata y *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura, Grapsidae, Varunidae) son cangrejos eurihalinos de importancia ecológica en áreas costeras y estuariales del Atlántico sudoccidental (Boschi, 1964, Iribarne et al., 1997; 2003; Spivak et al., 1994; Spivak, 1997).

N. granulata es un cangrejo semiterrestre con una distribución discontinua, desde Río de Janeiro hasta el golfo de San Matías a lo largo de las zonas intermareales del sudoeste atlántico, encontrándose, particularmente, en ecosistemas de marismas y estuarios (Boschi, 1964; Spivak et al., 1994; Iribarne et al., 1997; Bortolus e Iribarne, 1999). *N. granulata* se distribuye en hábitats heterogéneos, especialmente con respecto a la salinidad (Spivak et al., 1994; Iribarne et al., 1997; Giménez, 2003). *N. granulata* habita condiciones de salinidad ambiental extremas, que van desde agua dulce (ej. Bahía Samborombón) hasta sistemas hipersalinos (ej., Bahía Blanca) (Spivak, 1997). Además, se ha observado que *N. granulata* permanece activo durante la exposición al aire (emersión) (Boschi, 1964) y es capaz de mantener una alta tasa metabólica sin que se produzcan cambios significativos en la presión venosa de oxígeno (Dezi et al., 1987; Santos et al., 1987; Luquet y Ansaldo, 1997; Halperin et al., 2000). *N. granulata* desempeña un importante rol ecológico en las zonas intermareales y en las marismas, controlando o afectando distintos aspectos físico-químicos y biológicos en estos ambientes (revisión en Bianchini et al., 2008).

C. angulatus se distribuye lo largo de las costas del Atlántico sudoccidental desde Río de Janeiro (Brasil) hasta la Patagonia (Boschi, 1964) y desde Talcahuano (Chile) hasta Isla de San Lorenzo (Perú) en el Pacífico (revisión en Spivak, 1997). En la costa Atlántica, *C. angulatus*, habita áreas intermareales desde Puerto Deseado (48°S; Argentina) hasta Río de Janeiro (27°S; Brasil) (revisión en Spivak, 1997; Boschi, 2000). Habita el inter y submareal de costas marinas rocosas y estuarios (Iribarne et al., 1997, 2003; Spivak et al., 1994, revisión en Spivak, 1997).

La salinidad afecta varios aspectos de la biología e historia de vida de estos cangrejos y se ha propuesto como uno de los factores principales que afecta su distribución.

La laguna costera de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, Argentina) (37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O) se caracteriza por presentar marcadas fluctuaciones en la salinidad (desde 2 a 36 ‰) debido al régimen de mareas y a sus características geomorfológicas (Anger et al., 1994; Spivak et al., 1994; Marcovecchio et al., 2006; Beltrame et al., 2008). La zona de planicie de marea, exhibe abruptos, frecuentes y altamente variables cambios en la salinidad (entre 4 y 35 ‰) (Spivak et al., 1994; Bortolus et al., 2002, Marcovecchio et al., 2006; Beltrame et al., 2008). *N. granulata* y *C. angulatus* constituyen las especies de cangrejos dominantes en la laguna costera de Mar Chiquita en donde están expuestos a cambios abruptos, frecuentes y altamente variables en la salinidad ambiental exhibiendo, además, un distinto grado de adaptación a las condiciones estuariales y terrestres (Spivak et al., 1994). *N. granulata* es un cangrejo semiterrestre y excavador que habita las planicies de marea y praderas de *Spartina densiflora* de la región externa o estuarial (Spivak, 1994; Iribarne et al., 1997), exhibiendo períodos variables de emersión. *C. angulatus* posee hábitos más acuáticos y los individuos adultos se encuentran en el intermareal y submareal (Spivak, et al., 1994; Botto et al., 2005). A pesar de la importancia ecológica de *N. granulata* y *C. angulatus*, y que se han realizado varios estudios sobre distintos aspectos de la biología de estos cangrejos, faltan estudios sobre características y mecanismos de ajuste a nivel bioquímico en relación a variables ambientales clave (ej. salinidad, emersión).

Como parte de nuestros estudios integrativos sobre estrategias a nivel bioquímico y fisiológico en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales en *N. granulata* y *C. angulatus* provenientes de la planicie de marea de la laguna de Mar Chiquita, estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que estos cangrejos exhiben respuesta diferenciales a corto y largo plazo durante la hiperregulación de actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias

individuales (Schleich et al., 2001; López Mañanes et al., 2002). Así, ambos cangrejos exhiben flexibilidad a nivel bioquímico en branquias individuales en respuesta a la exposición a corto y largo plazo a salinidad reducida.

N. granulata exhibe un patrón de distribución y cambios diferenciales de la actividad de anhidrasa carbónica (CA) y de actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales en distintas condiciones de salinidad, sugiriendo la participación de estas enzimas como componentes de mecanismos de ajuste a nivel bioquímico frente a cambios en la salinidad (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al. 2001). La modulación diferencial de CA y Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales en salinidad reducida sugieren la existencia de diferencias funcionales y de mecanismos de regulación diferenciales en las distintas branquias de *N. granulata* (López Mañanes et al., 2000; Schleich et al., 2001).

C. angulatus exhibió cambios diferenciales de actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales luego de un cambio abrupto a salinidad reducida (10 y 6 ‰) aunque el patrón de respuesta fue diferente en ambas salinidades sugiriendo una dependencia del grado de estrés hipoosmótico (López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003; 2004).

Se ha demostrado preliminarmente un efecto diferencial de dopamina (DA) sobre la actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias anteriores y posteriores de *N. granulata* (Schleich et al., 1999) y la regulación diferencial *in vivo* e *in vitro* por serotonina de la actividad de Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales de *C. angulatus* en condiciones de hiperregulación (Elhalem y López Mañanes 2003), lo que sugiere la participación de estas aminas biogénicas en la regulación de componentes de mecanismos de ajuste a nivel bioquímico en salinidad reducida.

Por otro lado, hemos demostrado la existencia en músculo de la quela de *N. granulata* y *C. angulatus* de actividad Na^+/K^+ ATPasa sensible a la exposición a salinidad ambiental reducida. La mayor actividad de Na^+/K^+ ATPasa en baja salinidad sugiere la participación

del músculo de la quela y de esta actividad en mecanismos de ajuste a nivel bioquímico secundarios a la hiperregulación (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 a). La actividad Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela de ambos cangrejos exhibió características bioquímicas diferenciales. Además, demostramos preliminarmente la existencia en músculo de la quela de *C. angulatus* de actividad de fosfatasa alcalina (AP) a pH 9 (actividad de AP total) sensible a la salinidad y a DA sugiriendo el rol de AP en mecanismos de ajuste secundarios a la osmoionorregulación (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes 2003 b; 2004).

En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis fue realizar estudios de caracterización y regulación por factores ambientales de distintas actividades enzimáticas (Na^+/K^+ ATPasa, Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína, AP, proteolítica) en músculo de la quela y hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, Argentina) con el fin de:

- ampliar los conocimientos sobre estas enzimas en invertebrados;
- contribuir al esclarecimiento de su posible rol fisiológico en mecanismos de mantenimiento del medio interno y de mecanismos de ajuste frente a estrés ambiental;
- realizar un estudio integrativo de los mecanismos de ajuste frente a estrés ambiental en crustáceos decápodos de interés regional.

Para cumplir con el objetivo se llevaron a cabo:

- estudios para determinar la existencia y características bioquímicas de actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata* (Capítulo 1);
- estudios de caracterización de actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* (Capítulo 2) y de *C. angulatus* (Capítulo 6);

- estudios sobre el efecto de la salinidad y de la emersión sobre las actividades Na^+/K^+ ATPasa, Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína y de AP en músculo de la quela de *N. granulata* (Capítulos 3 y 5);
- estudios sobre el efecto de la salinidad ambiental sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus* (Capítulo 6);
- estudios sobre el efecto de mensajeros químicos sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* (Capítulo 3) y de *C. angulatus* (Capítulo 6) en condiciones de hiperregulación;
- estudios para determinar la existencia de actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 4) y de *C. angulatus* (Capítulo 7);
- estudios sobre el efecto de la exposición a salinidad ambiental reducida sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 4) y *C. angulatus* (Capítulo 7)
- estudios sobre el efecto de la emersión sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* (Capítulo 5).

CAPÍTULO 1:

ACTIVIDAD Na⁺ ATPasa INSENSIBLE A

OUABAÍNA EN MÚSCULO DE LA QUELA DE

Neohelice granulata

INTRODUCCIÓN

La Na^+/K^+ ATPasa o bomba clásica de sodio, transporta Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática estableciendo y manteniendo la alta concentración interna de K^+ y la baja concentración interna de Na^+ típicas de la mayoría de las células animales. Así, la Na^+/K^+ ATPasa desempeña un rol clave en el mantenimiento del gradiente de Na^+ necesario para la actividad de procesos de transporte involucrados en funciones celulares esenciales tales como control del potencial de membrana, control del volumen y pH celular, entrada de solutos, excitabilidad y contractilidad (revisión en Skou, 1997; Mobasher et al., 2000; Kaplan, 2002; Scheiner-Bobis, 2002; Xie y Askari, 2002; Jørgensen et al., 2003; Jaitovich y Bertorello, 2006). La ouabaína es un inhibidor altamente específico de la Na^+/K^+ ATPasa y es el principalmente utilizada para su detección *in vitro*, debido a que otras ATPasas del tipo P no son sensibles a la misma. La ouabaína se une al dominio extracelular de la Na^+/K^+ ATPasa cuando ésta se encuentra en su conformación E_2 y disminuye su afinidad por el K^+ , como un inhibidor competitivo (revisión en Féraille y Doucet, 2001).

En 1982, se identificó en membrana basolateral de túbulo proximal de riñón de cobayo, una actividad ATPásica activada por Na^+ coexistente con la Na^+/K^+ ATPasa (del Castillo et al., 1982). Posteriormente, se determinó la presencia de una actividad Na^+ ATPasa distinta de la bomba clásica de sodio en varios órganos y tejidos de vertebrados tales como intestino, cerebro e hígado de mamíferos (Marin et al., 1990; Caruso-Neves et al., 1997; 1999; 2002; Moretti et al., 1991; Thomas et al., 2003; Beltowski et al., 2004; Romero et al., 2005; Wengert et al., 2005), y riñón, branquias e intestino de peces (Moretti et al., 1991; Ventrella et al., 1990; 2001; Dópido et al., 2004; Romero et al., 2005; Wengert et al., 2005). A diferencia de la Na^+/K^+ ATPasa, la Na^+ ATPasa, no requiere K^+ , es refractaria a la ouabaína e inhibida fuertemente por furosemida (del Castillo y Robinson, 1985; Proverbio et al., 1986;

Moretti et al., 1991; Ventrella et al., 1992; Camejo et al., 1995; Caruso-Neves et al., 2002; Beltowski et al., 2004). Así, la diferente sensibilidad a los inhibidores ouabaína y furosemida se utiliza comúnmente para distinguir entre las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasa en tejidos animales. Aunque se sabe que la furosemida induce la fosforilación de la Na^+ ATPasa, se desconoce su exacto mecanismo de inhibición (Beltowski et al., 2004; del Castillo et al., 2005). La Na^+ ATPasa (también llamada la segunda bomba de sodio) participa en el eflujo de Na^+ desde la célula por medio del transporte de este ión en contra del gradiente electroquímico (del Castillo et al., 1982; del Castillo y Robinson, 1985; Proverbio et al., 1991; Caruso-Neves et al., 1997). La Na^+ ATPasa se purificó a partir de epitelio de intestino delgado de cobayo y se la identificó como un nuevo miembro de la familia de ATPasas del tipo P (Romero et al., 2005). En células de mamíferos, se ha propuesto que la Na^+ ATPasa participa en varias funciones esenciales (Caruso-Neves et al., 1997, 2002; Beltowski et al., 2004; Wengert et al., 2005). En peces teleósteos eurihalinos, se ha sugerido la participación de la actividad de Na^+ ATPasa branquial en mecanismos de transporte de sales en relación a la salinidad ambiental (Borgatti et al., 1985, Ventrella, 1992; 2001).

En comparación con vertebrados, la información acerca de la presencia y características de la Na^+ ATPasa en invertebrados es escasa. Además de la Na^+/K^+ ATPasa, se ha demostrado la coexistencia de actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína en túbulos de Malpighi de insectos hematófagos *Rhodnius sp.* (Caruso-Neves y Lopes, 2000), y en branquias y manto del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y de la almeja *Tapes philippinarum* (Pagliarani et al., 1996). En moluscos bivalvos, la Na^+ ATPasa participaría junto con la Na^+/K^+ ATPasa en la regulación de la concentración intracelular de Na^+ por medio del bombeo de este ión hacia el exterior celular (Pagliarani et al., 1996; 2006; 2008).

Para nuestro conocimiento, no se han realizado aún estudios para determinar la existencia de Na^+ ATPasa en cangrejos eurihalinos.

Neohelice granulata es un cangrejo eurihalino excavador se distribuye principalmente en el intermareal, en la laguna costera de Mar Chiquita, se distribuye tanto en las planicies de marea como en las áreas pobladas por *Spartina densiflora*, conocidas como “espartillar” (Boschi et al., 1964; Iribarne et al., 1997). La zona de planicie de marea, exhibe cambios abruptos, frecuentes y altamente variables en la salinidad (entre 4 y 35 ‰) (Spivak et al., 1994; Bortolus et al., 2002; Marcovechio et al., 2006; Beltrame et al., 2008).

Previamente, hemos demostrado la existencia de actividad Na^+/K^+ ATPasa sensible a la salinidad ambiental en músculo de la quela de *N. granulata* de la zona de planicie de marea de la laguna costera de Mar Chiquita. La mayor actividad de Na^+/K^+ ATPasa en individuos expuestos a baja salinidad sugiere la participación del músculo de la quela y de esta enzima en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación (Pinoni, 2003). En este contexto, en esta Tesis se llevaron a cabo estudios para determinar la existencia, características bioquímicas (presente Capítulo) y el efecto de distintos factores (Capítulos 3 y 5) sobre las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína detectadas en músculo de quela de *N. granulata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Na_2ATP (adenosin 5'-trifosfato, libre de vanadato), Tris-(hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina), ouabaína (Gstrofantina) y furosemida fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); azida sódica, sacarosa, ácido clorhídrico, cloruro de magnesio y cloruro de sodio fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); cloruro de potasio y Coomasie Blue (G250) fueron de Fluka (Alemania). Otros

productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Machos adultos de *Neohelice granulata* en intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967), con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, se recolectaron en la planicie de marea de la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, 37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Los individuos se transportaron inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección. Los cangrejos se mantuvieron al menos 10 días en acuarios en condiciones controladas de salinidad (10 ‰), temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y fotoperíodo (12 h. luz/ 12 h. oscuridad). El agua se aireó y filtró permanentemente. Los acuarios se cubrieron con nylon negro para reducir disturbios. Los individuos fueron alimentados tres veces por semana con alimento comercial (Cichlind T.E.N., Wardley, USA: 48 % hidratos de carbono, 40 % proteínas, 3 % grasas, 4 % fibras) (0,07 g por individuo) y fueron privados de alimento 48 h antes de los experimentos.

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos se crióanestesiaron durante 20 minutos. Posteriormente, se pesaron, se separaron ambas quelas y se abrieron para extraer el tejido muscular. Luego de pesar el tejido, se colocó inmediatamente en buffer de homogeneización (Sacarosa 0,25 M / EGTA -Tris 0,5 mM, pH 7,4) (8 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Para cada preparación se trabajó con músculo de ambas quelas extraídas de un único individuo. Los homogenatos se fraccionaron y se utilizaron inmediatamente para la

medición de las actividades ATPásicas o se almacenaron a -20 °C con glicerol 1,3 % p/v hasta su uso para la medición de la concentración de proteínas.

Determinación de la actividad Na^+ ATPasa

La actividad Na^+ ATPasa total se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de ATP en un medio de reacción conteniendo NaCl 130 mM, EGTA 0,5 mM, azida sódica 1 mM, MgCl_2 10 mM, en buffer Imidazol 20 mM (pH 7,4) en presencia de ouabaína 1 mM (concentración que inhibe el 100 % de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela de *N. granulata*; Pinoni, 2003). La actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida se determinó en el mismo medio en presencia de furosemida 2 mM. La actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida se determinó como la diferencia entre ambos ensayos. La actividad Mg^{2+} ATPasa residual se midió en el mismo medio reemplazando el NaCl por cloruro de colina y en presencia de furosemida 2 mM. En todos los casos se restó la correspondiente actividad Mg^{2+} ATPasa residual. Para mantener la fuerza iónica en el medio de reacción se utilizó cloruro de colina.

La cantidad adecuada de proteínas, entre 150 y 350 μg , (zona de linealidad de la curva de actividad versus concentración de proteínas del correspondiente homogenato) se agregó a la mezcla de reacción y se preincubó 5 min a 30° C. La reacción se inició por la adición de ATP (concentración final 3 mM). La incubación se llevó a cabo a 30° C durante 15 min. La reacción se interrumpió con el agregado de 2 ml de reactivo de Bonting (ácido sulfúrico 560 mM / molibdato de amonio 8,1 mM / sulfato ferroso 176 mM). Luego de 20 min a temperatura ambiente, se cuantificó el Pi liberado midiendo la absorbancia en 700 nm del complejo fosfomolibdato reducido (Bonting, 1970). El efecto de la temperatura sobre la actividad de

Na⁺ ATPasa total se determinó como se describió previamente pero variando la temperatura de incubación.

Para los estudios de caracterización, la actividad Na⁺ ATPasa se ensayó como se describió anteriormente pero en presencia de distintas concentraciones de cloruro de sodio/ cloruro de colina, ATP o a diferentes niveles de pH del medio de reacción según se indica para cada experimento.

Las actividades Na⁺ ATPasas se expresaron como nmoles Pi liberados x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre inmediatamente luego de la preparación de los homogenatos.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Análisis de resultados experimentales

El análisis estadístico se realizó usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico para muestras repetidas (RM- ANOVA). Se utilizó un test *a posteriori* ANOVA (Holm-Sidak) para identificar diferencias y un $p < 0,05$ se consideró como significativo. Los resultados del efecto de la concentración de sodio y de ATP se analizaron por medio de análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 2.01 software). Las curvas que se muestran son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores de

$K_{0,5}$ (concentración de sodio que produce la mitad de la máxima estimulación) y K_m (constante de Michaelis -Menten) se estimaron de las mismas (GraphPad Prism 2.01 software). I_{50} (concentración de furosemida que inhibe el 50 % de la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida) se calculó a partir de la curva de inhibición (GraphPad Prism 2.01 software).

RESULTADOS

Efecto del Na^+ sobre la actividad Na^+ ATPasa en músculo de la quela de *Neohelice granulata*

Inicialmente, para detectar la existencia de actividad Na^+ ATPasa en músculo de la quela de *N. granulata*, se determinó el efecto de concentraciones crecientes de Na^+ (20-150 mM) en condiciones de total inhibición de la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Fig. 1.1). La estimulación de la actividad ATPásica en estas condiciones demostró la presencia de actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína (actividad Na^+ ATPasa total). El Na^+ estimuló la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína en una manera dependiente de la dosis. La $K_{0,5}$ (concentración de Na^+ que produce la mitad de la estimulación máxima) fue 29 ± 13 mM (GraphPad Prism) (Fig. 1.1 A). La actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína total fue mayor en el rango de temperatura de 30 a 37°C (Fig. 1.1 B), siendo alrededor de 40 % menor a mayores y menores temperaturas.

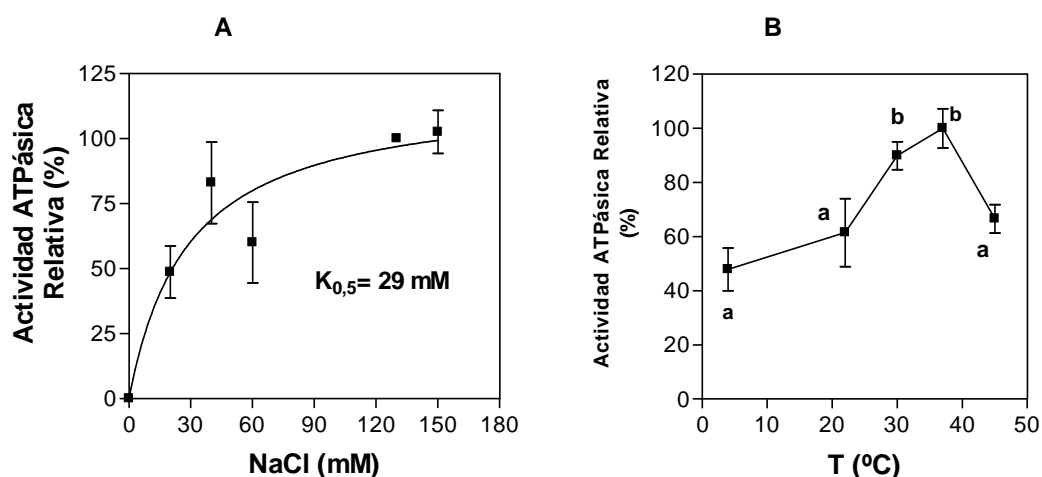


Figura 1.1. Efecto del Na^+ (20-150 mM) (A) y la temperatura (4-45°C) del medio de reacción (B) sobre la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína total en músculo de la quela de *N. granulata*. La medición de la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína se realizó en un medio conteniendo EGTA 0,5 mM, azida sódica 1 mM, MgCl_2 10 mM, en buffer Imidazol 20 mM (pH 7,4) en presencia de ouabaína 1 mM, y concentraciones variables de NaCl. La fuerza iónica del medio de reacción se mantuvo reemplazando el NaCl por cloruro de colina. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad en presencia de NaCl 130 mM (100%). La curva es la que mejor ajusta a los datos experimentales (GraphPad Prism 2.01). Los valores son la media \pm E.S. para 3 a 4 individuos.

Efecto de furosemida sobre la actividad Na^+ ATPasa en músculo de la quela de *N. granulata*

El efecto de furosemida sobre la actividad Na^+ ATPasa total se muestra en la Fig. 1.2. Furosemida produjo una inhibición de la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína en una manera dependiente de la dosis. La mayor inhibición (alrededor del 70 %) se obtuvo en presencia de furosemida 2-3 mM (Fig. 1.2). La inhibición por furosemida de la actividad Na^+ ATPasa total reveló la presencia de dos actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata*: una actividad sensible a furosemida y una actividad insensible a furosemida (69 ± 16 y 41 ± 7 nmoles de $\text{Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$ respectivamente) (Fig. 1.3).

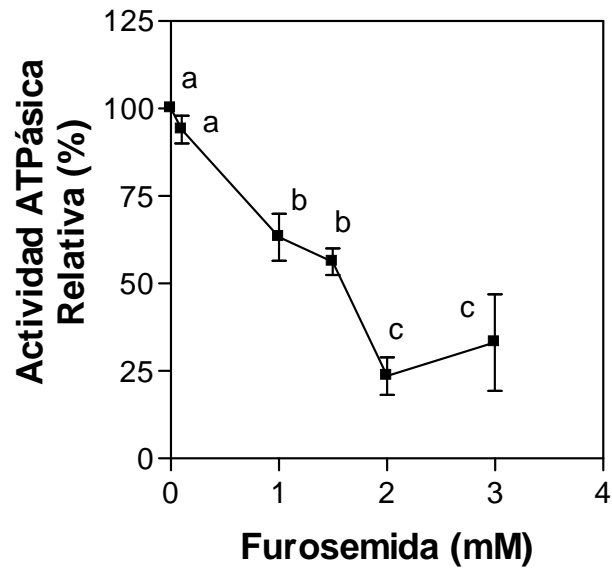


Figura 1.2. Efecto de furosemida (0,1-3,0 mM) sobre la actividad Na^+ ATPasa total en músculo de la quela de *N. granulata*. Los valores de actividad Na^+ ATPasa se expresan en relación de la actividad en ausencia de inhibidor (100%). Los valores son la media \pm E.S. para 3 a 4 individuos.

I_{50} (concentración que produce el 50 % de inhibición) para furosemida de la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida fue 1,4 mM.

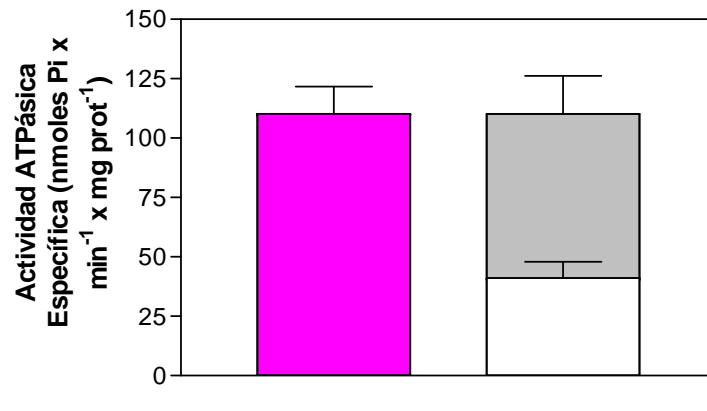


Figura 1.3. Actividades Na⁺ ATPasa total (■), insensible a furosemida (□) y sensible a furosemida (■) en músculo de la quela de *N. granulata*. La actividad se midió en presencia y ausencia de furosemida 2 mM. Los datos son la media ± E.S. para 10 individuos.

Efecto de concentraciones crecientes de ATP sobre las actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de N. granulata

En la Fig. 1.4 se observa el efecto de concentraciones crecientes de ATP sobre las actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata*. Las actividades Na⁺ ATPasas insensible y sensible a furosemida exhibieron una cinética de Michaelis-Menten ($K_m= 0,023$ y $0,213$ mM, respectivamente).

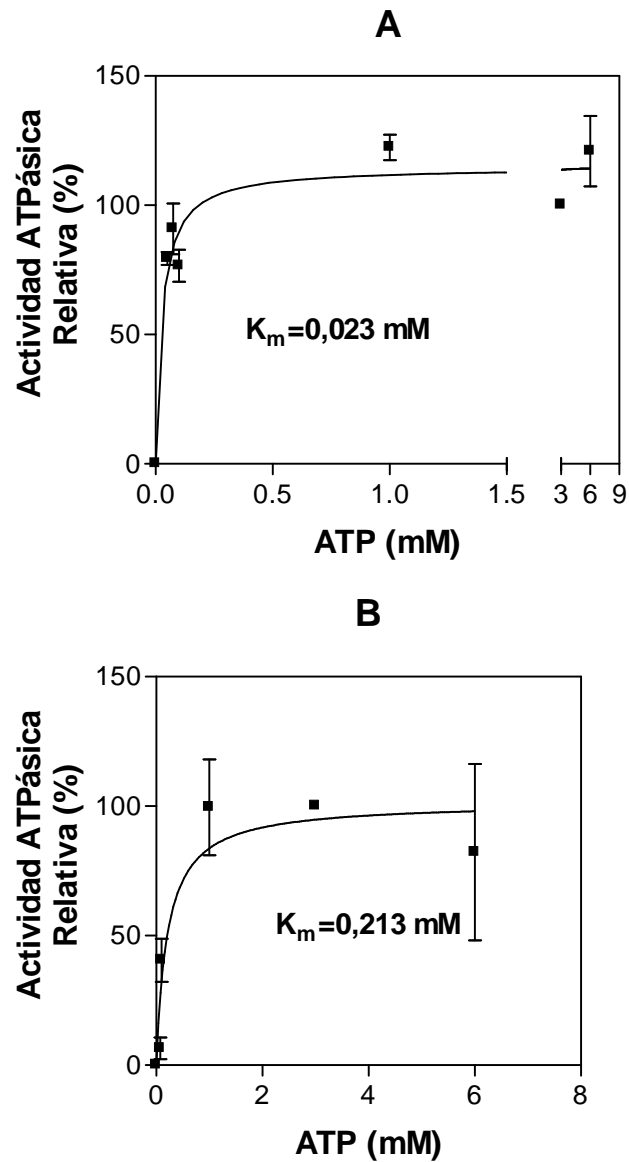


Figura 1.4. Efecto de concentraciones crecientes de ATP sobre las actividades Na^+ ATPasas insensible a furosemida (A) y sensible a furosemida (B) en músculo de la quela de *N. granulata*. Los valores de actividad están expresados en relación a la correspondiente actividad en presencia de ATP 3 mM (100 %). Los valores son la media \pm E.S. para 3 a 4 individuos. Las curvas son las que mejor ajustan a los datos experimentales (regresión no lineal, GraphPad Prism). En algunos casos las barras de error son menores que los símbolos utilizados.

Efecto del pH sobre las actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata*

La actividad Na⁺ ATPasa insensible a furosemida disminuyó desde pH 6,2 a pH 7,0. A pH 7,4 esta actividad se incrementó siendo similar a la actividad a pH 6,2-6,6. A pH 7,8, la actividad fue un 60 % menor que a pH 7,4 (Fig. 1.5 A). La actividad Na⁺ ATPasa sensible a furosemida se incrementó con un aumento del pH de 6,2 a 6,6-7,4. A pH 7,8 esta actividad disminuyó siendo alrededor del 40 % de la actividad a pH 7,4 (Fig. 1.5 B).

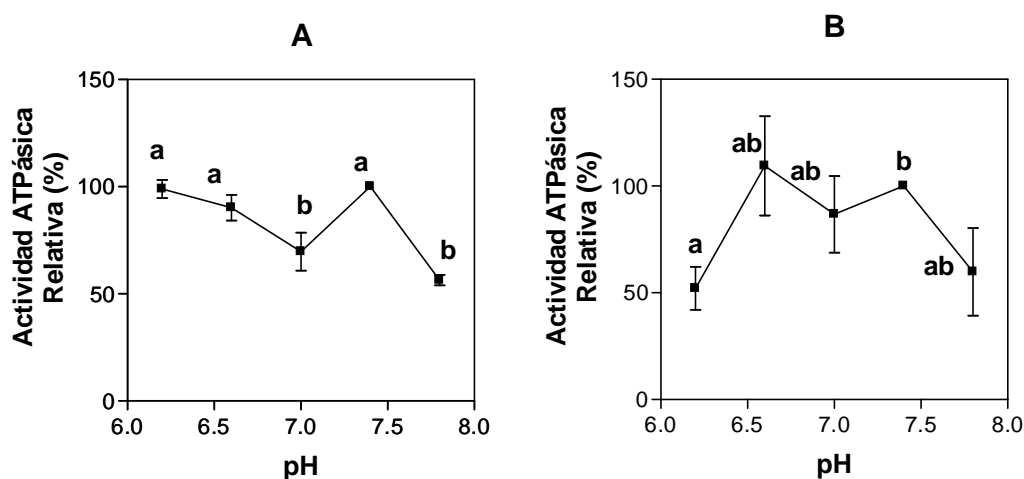


Figura 1.5. Efecto del pH (6,2-7,8) sobre las actividades Na⁺ ATPasas insensible a furosemida (A) y sensible a furosemida (B) en músculo de la quela de *N. granulata*. Los valores de actividad Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína se expresan en relación a la correspondiente actividad a pH 7,4 (100 %). Los valores son la media ± E.S. para 3 a 4 individuos.

DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo muestran la existencia, en músculo de la quela del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*, de dos actividades Na⁺ ATPasas insensibles a

ouabaína: una actividad sensible a furosemida y una actividad insensible a furosemida (Figs. 1.2 y 1.3).

En varios tejidos animales se ha demostrado la existencia, además de la Na⁺/K⁺ ATPasa, de una Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína (la llamada segunda bomba de sodio) (del Castillo et al. 1982; Caruso-Neves et al., 1997, 1998; Marin et al., 1990; Moretti et al., 1991; Pagliarani et al., 1996; Ventrella et al., 1990; 2001; Dórido et al., 2004). La diferente sensibilidad al glicósido ouabaína es una de las principales características distintivas entre las actividades ATPásicas coexistentes estimuladas por Na⁺ (Ventrella et al., 1987; Proverbio et al., 1991; Caruso-Neves et al., 2004; Pagliarani et al., 2007).

La actividad Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína de músculo de la quela de *N. granulata* mostró una menor sensibilidad al Na⁺ (Fig. 1.1 A) que lo reportado para mamíferos (del Castillo et al., 1982; Camejo et al., 1995) y túbulos de Malpighi del insecto *Rhodnius prolixus* (Caruso-Neves et al., 1998). Sin embargo, la concentración de Na⁺ que produce la mitad de la estimulación máxima (K_{0,5}) de la actividad Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata* (Fig. 1.1 A) fue similar a lo reportado para los protozoos *Trypanosoma cruzi* (Liozumi et al., 2006) y *Leishmania amazonensis* (de Almeida-Amaral et al., 2008).

La máxima inhibición de la actividad Na⁺ ATPasa sensible a furosemida en músculo de la quela de *N. granulata* se produjo en presencia de furosemida 2 mM (Fig. 1.2). Esta concentración de furosemida inhibe totalmente la actividad Na⁺ ATPasa insensible a ouabaína de *L. amazonensis*, insectos hematófagos y mamíferos (del Castillo et al., 1982; Caruso-Neves y Lopes, 2000; Caruso-Neves et al., 2002; de Almeida-Amaral et al., 2008). Así, a diferencia de lo reportado para mamíferos e insectos (Castillo et al., 1982; Caruso-Neves y Lopes, 2000), se encontró una actividad Na⁺ ATPasa insensible a furosemida en músculo de la quela de *N. granulata* (Fig. 1.3).

Las actividades Na^+ ATPasas insensible y sensible a furosemida de músculo de la quela de *N. granulata* exhibieron características bioquímicas diferentes a la coexistente Na^+/K^+ ATPasa (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003a). A diferencia de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína se ajustaron a una cinética de tipo michaeliana en respuesta al ATP (Fig. 1.3). El comportamiento de las actividades Na^+ ATPasas sensible e insensible a furosemida en respuesta al ATP fue similar a lo reportado para las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína del protozoo *L. amazonensis* (Almeida-Amaral et al., 2008) y de riñón de cerdo (Caruso-Neves et al., 2002). Sin embargo, los valores de K_m de ambas actividades Na^+ ATPasas en músculo de *N. granulata* fueron menores a los reportados para las actividades Na^+ ATPasas de riñón de cobayo (del Castillo et al., 1982) y *L. amazonensis* (de Almeida-Amaral et al., 2008). Además, las actividades Na^+ ATPasas sensible e insensible a furosemida de músculo de la quela de *N. granulata* (Fig. 1.5) mostraron una baja sensibilidad a las variaciones de pH, dentro del rango estudiado, en comparación con la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003a).

Por otro lado, aunque las actividades Na^+ ATPasas insensible y sensible a furosemida exhiben distintas características bioquímicas (sensibilidad a furosemida, valores de K_m para el ATP, respuesta al pH) (Figs. 1.2, 1.4, 1.5) se requiere mayor investigación para establecer la existencia de diferentes isoformas de Na^+ ATPasas en músculo de la quela de *N. granulata*.

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran la presencia en músculo de la quela de *N. granulata*, de dos actividades Na^+ ATPasas: una actividad sensible a furosemida y una actividad insensible a furosemida. Estas actividades son co-existentes con la actividad Na^+/K^+ ATPasa. Para nuestro conocimiento, este trabajo constituye el primero en demostrar la existencia de actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en cangrejos eurihalinos.

CAPÍTULO 2:

ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA EN

MÚSCULO DE LA QUELA DE *Neohelice granulata*

INTRODUCCIÓN

Muchos procesos biológicos son regulados por la formación (fosforilación) y el clivaje (defosforilación) de ésteres de fosfato, dos de las reacciones químicas más cruciales llevadas a cabo por todos los organismos vivientes. El proceso de defosforilación es catalizado por diferentes fosfatasas. Las fosfatasas alcalinas (AP) (EC 3.1.3.1) son metaloenzimas ubicuas, que catalizan la hidrólisis de monoésteres de fosfato de un amplio rango de sustratos a pH superiores a 7,0 (Ohkubo et al, 1974; Cyboron et al, 1982; Lau et al., 1985; Bortolato et al., 2002; Angkawidjaja et al., 2006; Mugilova et al., 2007). Las AP han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas en bacterias (revisión en Holtz y Kantrowitz, 1999; Angkawidjaja et al., 2006; Weichel et al., 2008) y en mamíferos, particularmente en humanos (Hoylaerts et al, 1997; Milan et al., 2001; Hessle et al., 2002; Ali et al., 2006 a,b; Nakano et al., 2006; Caseli et al., 2008).

En mamíferos, se han identificado varias formas de AP las cuales exhiben una distribución diferencial en distintos órganos y tejidos (Muginova et al., 2007; Sharp et al., 2007). Las distintas formas de AP en mamíferos exhiben propiedades bioquímicas diferenciales entre ellas la distinta sensibilidad a inhibidores, tales como el levamisol (Van Belle, 1976; Cyboron et al., 1982; Chan y Stinson, 1986; Calhau et al., 2000; Ali et al., 2006a) y varios aminoácidos (fenilalanina, glicina, cisteína y arginina) (Pekasthy et al., 1972; Hoylaerts et al., 1997; Mota et al., 2008). La inhibición diferencial por levamisol y aminoácidos se utiliza comúnmente para identificar diferentes formas de AP de mamíferos (Van Belle, 1976; Cyboron et al., 1982; Chan y Stinson, 1986; Calhau et al., 2000; Ali et al., 2006a; Mota et al., 2008). Las distintas isoenzimas e isoformas de AP han sido involucradas en varios procesos fisiológicos tales como la mineralización de cartílago y hueso (revisión en Warnes, 1972; Cyboron, et al., 1982; Moss, 1992; Hessle et al., 2002; Balcerak et al., 2003;

Hoemann et al., 2008; Williford et al., 2008); metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, nucleótidos y fosfolípidos (revisión en Pekarthy et al., 1972; Warnes, 1972; Register y Wuthier, 1984; Mahmood et al, 1994; Narisawa et al., 2003; Ali et al., 2006b; Nakano et al., 2006), y la absorción, transporte de nutrientes y procesos de detoxificación en intestino (revisión en Warnes, 1972; Moss, 1992; Geddes y Philpott, 2008; Goldberg et al., 2008).

En aves, se observó la relación directa entre la actividad de AP y la velocidad de mineralización del hueso (Tilgar et al., 2008). En anfibios, se ha sugerido que la AP está involucrada en respuestas osmorregulatorias (Dore et al., 2000). En la trucha *Salmo gairdneri* la respuesta de la actividad de AP en branquias e intestino frente a variaciones en la salinidad ambiental sugirió su participación en procesos osmorregulatorios (Gasser y Kirschner, 1987). En base a las variaciones diferenciales en la actividad en distintos órganos (hígado, músculo y riñón) de especies de peces se ha propuesto a la AP como marcadora de estrés (Majhi et al., 2006).

En comparación con vertebrados, particularmente mamíferos, las AP en invertebrados han sido mucho menos estudiadas. Se ha identificado y caracterizado parcialmente la actividad de AP en diferentes órganos y tejidos de invertebrados tales como hepatopáncreas del camarón *Pandalus borealis* (Olsen et al., 1991), tracto digestivo de larvas de la polilla *Lymantria dispar* (Lee et al, 1998), y del cangrejo verde *Scylla serrata* (Chen et al., 1996, 1997, 2000, 2005; Park et al., 2001), en vísceras del bivalvo *Pinctada fucata* (Chen y Zhou, 1999; Xiao et al., 2002), en varios órganos de la almeja *Scrobicularia plana* (Mazorra et al., 2002) y en tracto digestivo y túbulos de Malpighi del escarabajo *Leptinotarsa decemlineata* (Yi y Adams, 2002). En epitelio de hepatopáncreas de larvas del gusano de seda *Bombix mori*, se han identificado dos isoenzimas de AP (unida a membrana y soluble) con distinta antigenicidad y características bioquímicas, como la inhibición diferencial por levamisol y pH óptimo (revisión en Eguchi et al., 1995; Itoh et al., 1999). Sin embargo, el rol fisiológico de

las AP en invertebrados no ha sido siempre claramente establecido. En el cangrejo *S. serrata*, AP estaría involucrada en la absorción de fosfato y calcio a partir del agua de mar y en la formación del caparazón (Park et al., 2001). En *Drosophila virilis*, se observó una disminución en la actividad de AP luego de estrés por calor (Sukhanova et al., 1996). Se ha propuesto a la actividad de AP como potencial indicador bioquímico de estrés por diversos metales pesados en la almeja *S. plana* (Mazorra et al., 2002), por cobre en el cangrejo de agua dulce *Spiralothelphusa hydrodroma* (SenthilKumar et al., 2007), y de toxicidad por naftaleno en el cangrejo *S. serrata* (Elumalai y Balasubramanian, 1999; Vijayavel y Balasubramanian, 2006) y por endosulfán en el langostino *Macrobrachium malcolmsonii* (Bhavan y Geraldine, 2004).

La AP en cangrejos eurihalinos ha sido escasamente estudiada. En el cangrejo *Carcinus maenas*, la exposición a metales induce una disminución de la actividad de AP en ovario (Elumalai et al., 2005). En branquias posteriores del cangrejo eurihalino *Callinectes sapidus*, se han encontrado dos actividades de AP, una levamisol sensible y otra levamisol insensible con una respuesta diferencial a la salinidad reducida (Lovett et al., 1994). La respuesta de la actividad de AP en branquias posteriores de *C. sapidus* en condiciones de baja salinidad sugirió su rol en la modulación de la respuesta osmorregulatoria de este cangrejo, probablemente como efectora del aumento de la actividad Na^+/K^+ ATPasa branquial (Lovett et al., 1994).

Hemos demostrado, previamente, la existencia en músculo de la quela de *N. granulata* de la laguna costera de Mar Chiquita, de una alta actividad Na^+/K^+ ATPasa en salinidad ambiental reducida lo que sugiere la participación del músculo de la quela en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación (Pinoni, 2003). En este contexto, hemos determinado preliminarmente la existencia de actividad de AP a pH 8,0 y 9,0 (actividad total de AP) en músculo de la quela (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 b). En la presente tesis, se

llevaron a cabo estudios de caracterización de la actividad de AP (presente Capítulo) y el efecto de distintos factores sobre las actividades detectadas (Capítulos 3 y 5).

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Tris (tris-hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina) y levamisol (L [-]-2, 3, 5, 6-Tetrahydro-6-fenilimidazol [2,1-b] thiazol hidrocloreuro) fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); pNP (p-nitrofenol), sacarosa, sulfato de cobre y ácido clohídrico fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); sulfato de magnesio, Coomassie Blue (G250) y pNPP (p-nitrofenilfosfato) fueron de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Machos adultos de *Neohelice granulata* en intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967), con un ancho de caparazón mayor a 2,5 cm, se recolectaron en la planicie de marea de la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, 37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Los individuos se transportaron inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección. Los cangrejos se mantuvieron al menos 10 días en acuarios en condiciones controladas de salinidad (35 ‰), temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y fotoperíodo (12 h. luz/ 12 h. oscuridad). El agua se aireó y filtró permanentemente. Los acuarios se cubrieron con nylon negro para reducir disturbios. Los individuos fueron alimentados tres veces por semana con

alimento comercial (Cichlind T.E.N., Wardley, USA: 48 % hidratos de carbono, 40 % proteínas, 3 % grasas, 4 % fibras) (0,07 g por individuo) y fueron privados de alimento 48 h antes de los experimentos.

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos se crióanestesiaron durante 20 minutos. Posteriormente, se separaron ambas quelas y se abrieron para extraer el tejido muscular. Luego de pesar el tejido, se colocó inmediatamente en buffer de homogeneización (Sacarosa 0,25 M / EGTA -Tris 0,5 mM, pH 7,4) (8 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Para cada preparación se trabajó con músculo de ambas quelas extraídas de un único individuo. El homogenato se fraccionó en alícuotas, se agregó glicerol (1,3 % v/v) y almacenó a -20° C hasta su uso.

Determinación de la actividad de AP

La actividad de AP se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de pNPP en un medio conteniendo SO₄Mg 4 mM en buffer Tris 100 mM / HCl (pH 7,7) en ausencia (actividad total de AP) y en presencia de levamisol 16 mM (actividad de AP insensible a levamisol). La actividad de AP sensible a levamisol fue estimada como la diferencia entre ambos ensayos.

La cantidad adecuada de proteínas, entre 250 y 400 µg, (zona de linealidad de la curva de actividad versus concentración de proteínas del correspondiente homogenato de músculo) se agregó a la mezcla de reacción y se preincubó 5 minutos a 37° C. La reacción de fosfatasa se inició por la adición de pNPP (concentración final 9,5 mM). La incubación se realizó a 37°

C durante 30 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de 2 ml de KOH 0,1 M. El pNP liberado se cuantificó por medición de la absorbancia en 410 nm.

Para otros estudios de caracterización, la actividad de AP se ensayó como se describió anteriormente pero en presencia de distintas concentraciones de pNPP o a diferente pH del medio de reacción según se indica para cada experimento. El efecto de la temperatura sobre la actividad de AP se determinó como se describió previamente pero variando la temperatura de incubación.

Para estudiar el efecto del Cu^{2+} sobre las actividades de AP, la actividad se midió como se describió previamente pero en presencia de concentraciones crecientes de CuSO_4 en el medio de reacción.

La actividad de AP se expresó como $\text{nmoles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre con muestras que no fueron previamente descongeladas. El congelado de las muestras no alteró los valores de la actividad de AP.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Análisis de resultados experimentales

Los resultados experimentales del efecto del pNPP sobre la actividad de AP fueron analizados por medio de regresión no lineal (ecuación de Michaelis-Menten: un sitio de unión) mediante el programa GraphPad Prism versión 2.01. El programa calcula el mejor ajuste de

los resultados experimentales a un modelo matemático dado. Las curvas que se muestran son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) fueron estimados por el programa a partir de esas curvas.

I_{50} (concentración de levamisol que inhibe el 50 % de la actividad de AP sensible a levamisol) fue calculada a partir de la curva de inhibición (programa GraphPad Prism 2.01).

Se utilizó análisis de varianza para muestras repetidas (RM-ANOVA) para estimar la significancia estadística de las diferencias. Un $p < 0,05$ fue considerado como significativo. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Sigma Stat 3.0.

RESULTADOS

*Actividades de AP en músculo de la quela de *Neohelice granulata*: efecto del pH, levamisol y aminoácidos*

Inicialmente, se determinó la actividad total de AP dentro del rango de pH de 7,4 a 9,0. La actividad de AP fue similar dentro del rango de pH de 7,4 a 8,0 (pH 8,0: 1699 ± 125 nmoles de pNP \times $\text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$, respectivamente); mientras que a pH 9,0 la actividad fue de alrededor de un 37 % de la actividad a pH 8,0. Posteriormente, se estudió el efecto de concentraciones crecientes de levamisol sobre la actividad total de AP a pH 7,4; 7,7 y 8,0 (Fig. 2.1). La actividad total de AP de músculo fue inhibida por levamisol en una manera dependiente de la dosis. La inhibición por levamisol reveló la presencia en músculo de la quela de *N. granulata* de dos actividades de AP (una sensible a levamisol y otra insensible a levamisol) (Fig. 2.1).

Se determinó el efecto del pH (7,4 - 9,0) sobre las actividades de AP encontradas en músculo de *N. granulata* (Fig. 2.2). La actividad de AP insensible a levamisol fue máxima a

pH 7,7 0 (1902 ± 150 nmoles de pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹). A pH 9,0, esta actividad fue sólo del 34 % de la actividad a pH 7,7 (Fig. 2.2 A). La actividad de AP sensible a levamisol fue similar dentro del rango de pH de 7,4 a 8,0 (pH 7,7: 557 ± 98 nmoles de pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹); disminuyendo alrededor de un 60 % a pH 9,0 (Fig. 2.2 B).

*I*₅₀ (concentración de levamisol que produjo el 50 % de la inhibición de la actividad de AP sensible a levamisol) fue, aproximadamente, 12 mM (Fig. 2.3).

Los aminoácidos glicina y cisteína (0,2-100,0 mM) no afectaron la actividad de AP insensible a levamisol ni la actividad de AP sensible a levamisol (datos no mostrados).

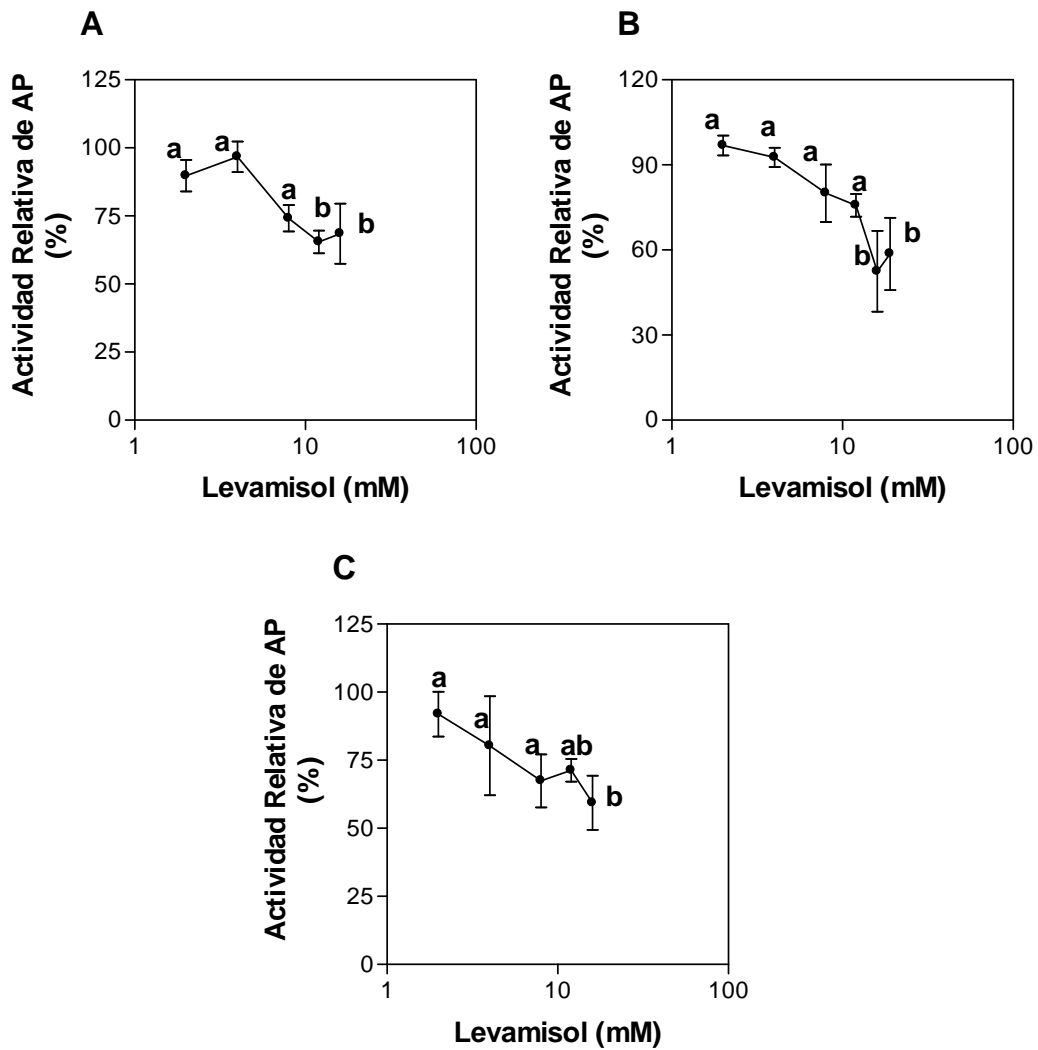


Figura 2.1. Actividad total de AP a pH 7,4 (A), 7,7 (B) y 8,0 (C) en músculo de la quela de *N. granulata* en presencia de levamisol (2-19 mM). La actividad específica en ausencia de levamisol se tomó como el 100%. Los valores son las medias \pm E.S. para 3 individuos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

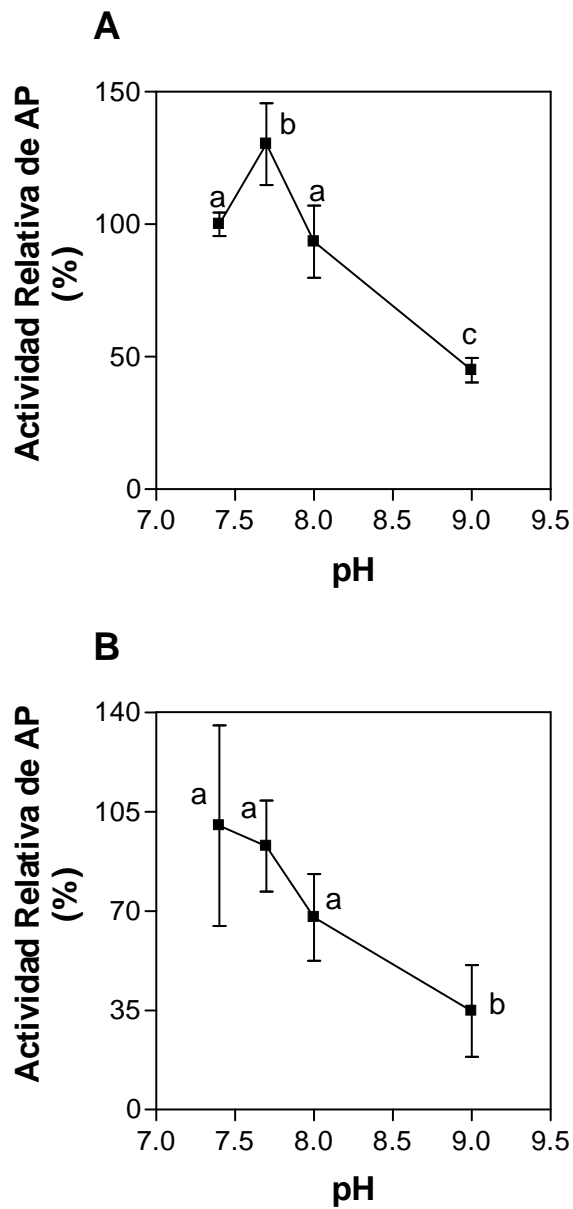


Figura 2.2. Efecto del pH (7,4-9,0) sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en músculo de la quela de *N. granulata*. La actividad específica a pH 7,4 se tomó como el 100 %. Los valores son las medias \pm E.S. para 3 individuos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

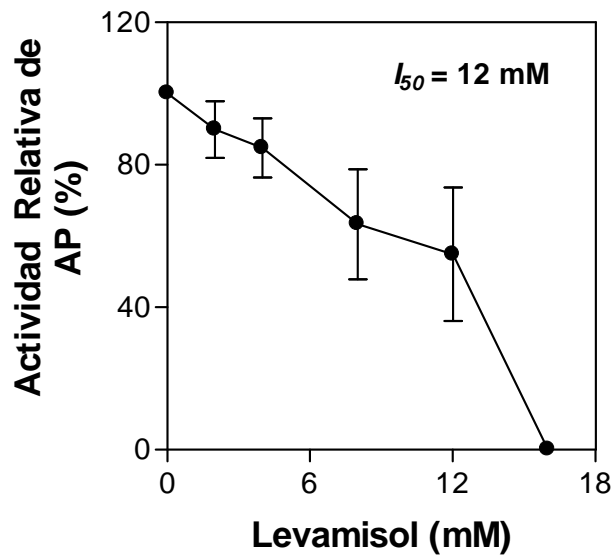


Figura 2.3. Efecto del levamisol (2-16 mM) sobre la actividad de AP sensible a levamisol a pH 7,7 en músculo de la quela de *N. granulata*. La actividad máxima de AP sensible a levamisol se tomó como el 100 %. I_{50} : concentración de levamisol que produce el 50 % de inhibición de la actividad de AP sensible a levamisol, se calculó por GraphPad Prism 2.01. Los valores son las medias \pm E.S. para 3 individuos.

Efecto del pNPP sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*

La Fig. 2.4 muestra el efecto de concentraciones crecientes de pNPP sobre las actividades de AP a pH 7,7 en músculo de la quela de *N. granulata*. La actividad de AP insensible a levamisol y la actividad de AP sensible a levamisol exhibieron una cinética de tipo michaeliana ($K_m=0,79$ y $1,42$ mM, respectivamente).

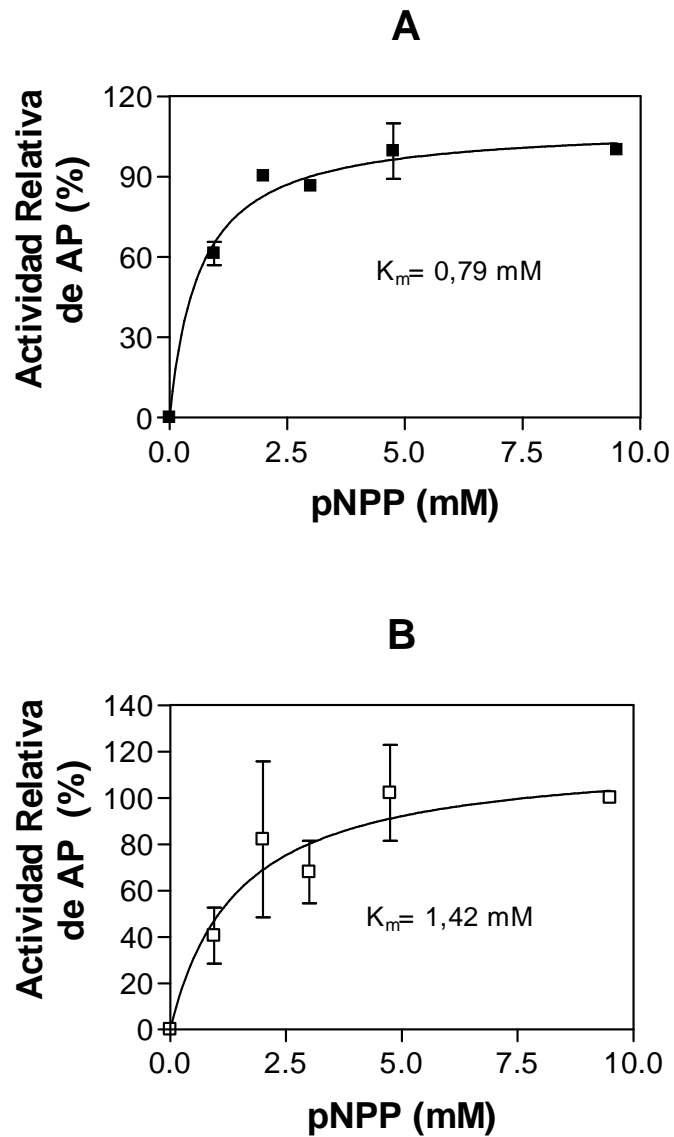


Figura 2.4. Efecto del pNPP sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) a pH 7,7 en músculo de la quela de *N. granulata*. La correspondiente actividad de AP en presencia de pNPP 9,5 mM se tomó como el 100 %. Las curvas son las que mejor ajustan a los datos experimentales (GraphPad Prism 2.01). Los valores son las medias \pm E.S. para 3 individuos. En algunos casos, las barras de error fueron menores a los símbolos usados.

Efecto de la temperatura sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*

Las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol a pH 7,7 fueron diferencialmente afectadas por la temperatura del medio de reacción (Fig. 2.5). La actividad insensible a levamisol se incrementó luego de un aumento de la temperatura de 5 a 30-37 °C. A mayores temperaturas, la actividad de AP insensible a levamisol disminuyó, siendo a 45 y 60 °C alrededor de un 29 % de la actividad a 37 °C (Fig. 2.5 A). La actividad de AP sensible a levamisol fue marcadamente sensible a la temperatura del medio de reacción. La actividad máxima se observó a 37 °C. A menores (4-30 °C) o mayores (45-60 °C) temperaturas, esta actividad fue alrededor de un 16 % de la actividad a 37 °C (Fig. 2.5 B).

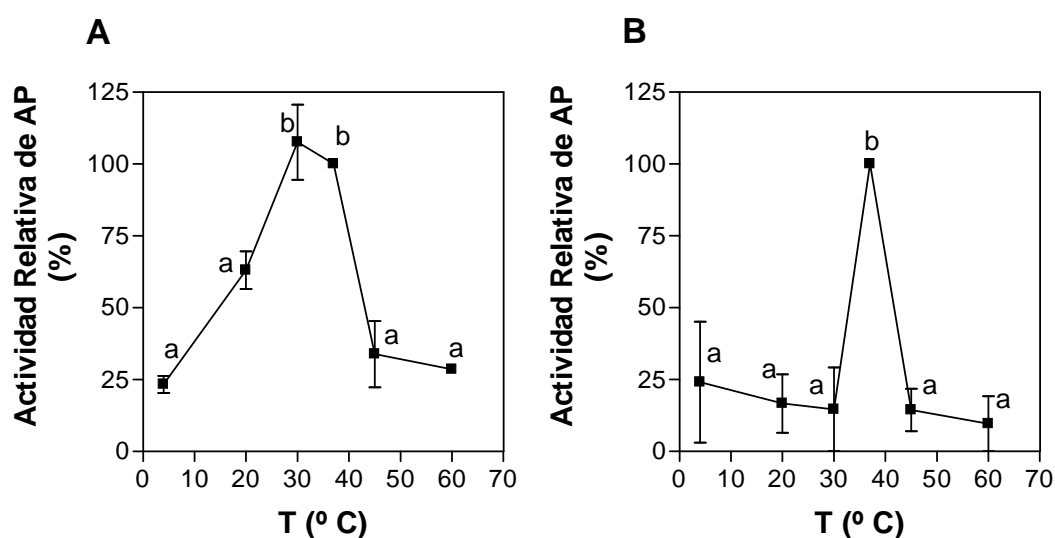


Figura 2.5. Efecto de la temperatura (4-60 °C) sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) a pH 7,7 en músculo de la quela de *N. granulata*. La correspondiente actividad específica a 37 °C se tomó como el 100 %. Los valores son las medias \pm E.S. para 3 individuos. En algunos casos, las barras de error fueron menores a los símbolos usados. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Efecto del Cu^{2+} sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*

En la Tabla 2.1 se muestra el efecto del Cu^{2+} en la mezcla de reacción sobre las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol. Ambas actividades fueron fuertemente inhibidas por Cu^{2+} (63,1-81,8 % la actividad de AP insensible a levamisol y 77,8 - 98,8 % la actividad de AP sensible a levamisol). No se observaron cambios significativos dentro del rango de Cu^{2+} utilizados (0,05-1,00 mM).

Tabla 2.1. Efecto del Cu^{2+} sobre las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* aclimatados a 35 % de salinidad.

CuSO ₄ (mM)	Inhibición (%)	
	Actividad de AP	Actividad de AP
	Insensible a levamisol	Sensible a levamisol
0,05	63,1±2,4*	77,8±5,1*
0,20	74,3±3,1*	77,4±11,3*
1,00	81,8±2,7*	98,8±1,3*

La actividad específica en ausencia de CuSO₄ fue tomada como el 100 %. Los valores son las medias ± E.S. para 3 individuos. * Indica diferencia significativa de la correspondiente actividad en ausencia de CuSO₄ (p<0,05).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran la existencia en músculo de la quela de *Neohelice granulata* de dos actividades de AP: una insensible a levamisol y una sensible a levamisol. En mamíferos, se han identificado varias isoformas e isoenzimas de AP las cuales difieren entre sí en inmunogenicidad, termoestabilidad, movilidad electroforética y sensibilidad a inhibidores (Pekarthy et al., 1972; McComb et al., 1979; Hoylaerts et al., 1997; Calhau et al., 2000; Dziejczko et al., 2005; Ali et al., 2006a; Sharp et al., 2007; Mota et al., 2008). La inhibición diferencial por levamisol y aminoácidos se utiliza comúnmente para identificar diferentes formas de AP (Van Belle, 1976; Cyboron et al., 1982; Chan y Stinson, 1986; Calhau et al., 2000; Ali et al., 2006a; Mota et al., 2008). En homogenatos de branquias posteriores del cangrejo eurihalino *Callinectes sapidus* también se describió la presencia de actividades de AP insensible y sensible a levamisol (Lovett et al., 1994). Contrariamente a lo observado para la actividad de AP de tracto digestivo del cangrejo *Scylla serrata* (Chen y Zhou, 1999; Zhu et al., 1999) y de branquias posteriores de *C. sapidus* (Lovett et al., 1994), las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* fueron insensibles a los aminoácidos glicina y cisteína.

Las actividades de AP en mamíferos se caracterizan por exhibir un alto pH óptimo (Ohkubo et al., 1974; Cyboron y Wuthier, 1981; Chan y Stinson, 1986; Bortolato et al., 2002; Simao et al., 2007). Las actividades de AP de distintos órganos o tejidos de invertebrados exhiben un rango de pH óptimo entre 7,1 y 10,5 (Lovett et al., 1994; Funk et al., 2001; Mazorra et al., 2002; Xiao et al., 2002; Rodrigues et al., 2006). Los resultados del presente Capítulo muestran que las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* exhibieron una diferente respuesta al pH (Fig. 2.2). La mayor actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* a pH 7,7

concuerta con el pH óptimo para esta actividad en branquias posteriores de *C. sapidus* (Lovett et al., 1994). La actividad de AP sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* (Fig. 2.2) fue diferente a la respuesta de esta actividad en branquias posteriores de *C. sapidus* la cual exhibió un pH óptimo a 9,1 (Lovett et al., 1994).

El comportamiento cinético de Michaelis-Menten con respecto al pNPP de las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* (Fig. 2.4), concuerda con lo descrito previamente para las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en homogenatos de branquias de *C. sapidus* (Lovett et al., 1994) y para la AP purificada de tracto digestivo del cangrejo *S. serrata* (Chen et al., 2000).

Las AP de diferentes tejidos animales muestran una sensibilidad variable a la temperatura (Olsen et al., 1991; Àsgeirsson et al., 1995; Funk et al., 2001; Bortolato et al., 2002). En invertebrados, la temperatura óptima depende de la especie. Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* fueron fuertemente afectadas por la temperatura de la mezcla de reacción, aunque exhibieron una sensibilidad diferente (Fig. 2.5). La baja actividad de AP a altas temperaturas fue similar a lo descrito para la AP purificada de vísceras de *Pinctada fucata* (Xiao et al., 2002) y de tracto digestivo de *S. serrata* (Chen et al., 1997).

El cobre es uno de los principales contaminantes marinos que produce la inhibición de varias enzimas en invertebrados (Brooks y Mills, 2003; Jing et al., 2006; Seo et al., 2006). Se ha observado la inhibición de la actividad de AP por Cu^{2+} en diferentes tejidos de los bivalvos *Pinctada fucata* (Xiao et al., 2002; Jing et al., 2006) y *Scrobicularia plana* (Mazorra et al., 2002), y el cangrejo *Scylla serrata* (Chen et al., 2000). Estudios *in vivo* en *N. granulata* mostraron el efecto hipoglicemiante del cobre sugiriendo su acción como disruptor endócrino inhibiendo la secreción de la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH) (Medesani et al., 2001; 2004). Estudios *in vitro* han demostrado la inhibición de la actividad de anhidrasa

carbónica branquial por cobre en *N. granulata* (Vitale et al., 1999), y se ha sugerido que éste, como otros contaminantes, pueden afectar la capacidad osmoionorregulatoria (revisión en Bianchini et al., 2008). Las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* fueron fuertemente inhibidas *in vitro* por cobre (Tabla 2.1). La inhibición *in vitro* por cobre de las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* podría indicar su potencial uso en estudios ecotoxicológicos. Sin embargo, son necesarios más estudios acerca de la respuesta de estas actividades al cobre y otros metales pesados para establecer si podrían servir como indicadores de estrés debido a metales pesados.

En conclusión, los resultados del presente capítulo muestran la existencia de dos actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*: una actividad insensible a levamisol y una actividad sensible a levamisol con diferentes características bioquímicas. Si las características bioquímicas diferenciales de ambas actividades (sensibilidad a levamisol, K_m , sensibilidad al pH y temperatura) se debe a la presencia de distintas isoenzimas o isoformas de AP requiere mayor investigación.

CAPÍTULO 3:

RESPUESTAS A SALINIDAD AMBIENTAL DE

ACTIVIDADES Na⁺ ATPasas Y DE FOSFATASA

ALCALINA EN MÚSCULO DE LA QUELA DE

Neohelice granulata

INTRODUCCIÓN

La flexibilidad fenotípica involucra variaciones reversibles, dentro de un individuo, en respuesta a cambios espacio-temporales en las condiciones ambientales (Piersma y Drent, 2003). Las variaciones en las condiciones externas (factores bióticos y abióticos) pueden disparar mecanismos de ajuste a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico y/o comportamental (Kirschner, 1991, 2004; Bozinovic, 2003). Estas respuestas parecen ser dependientes de la especie, hábitat y tipo de estrés y no siempre se producen en forma conjunta.

Los cangrejos eurihalinos que habitan zonas de mareas, aguas costeras y estuarios están expuestos a variaciones espacio-temporales marcadas en distintas condiciones ambientales, particularmente en la salinidad, la cual constituye una variable ambiental clave para la biología de los mismos (Chapman y Wang, 2001; Brockway et al. 2006). La supervivencia en ambientes de salinidad variable requiere de estrategias a distintos niveles para controlar los movimientos de agua e iones entre el organismo y el medio externo (revisión en Kirschner, 1991; 2004).

En salinidad reducida, los cangrejos hiperreguladores absorben activamente Na^+ y Cl^- desde el medio externo, a través de las branquias, compensando la pérdida de sales y regulando de esta manera las concentraciones iónicas en la hemolinfa (revisión en Lucu y Towle, 2003; Kirschner, 2004). La capacidad de los cangrejos hiperreguladores de adaptarse a salinidades reducidas involucra la activación de su maquinaria osmoionorregulatoria a distintos niveles (desde molecular a organismo). En general, en las especies estudiadas, las branquias posteriores constituyen el sitio principal donde ocurren ajustes a nivel bioquímico involucrados en la toma activa de iones (revisión en Towle, 1993, 1997; Onken y Riestenpatt, 1998; Ahearn et al., 1999; Onken et al. 2002; Morris, 2001; Towle y Weihrauch, 2001;

Kirschner, 2004; Lucu y Towle, 2003) (Luquet et al., 2002; Genovese et al., 2004; Lovett et al., 2006; Tsai y Lin, 2007; Lucu et al., 2008). La actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias posteriores constituye uno de los componentes centrales a nivel bioquímico del proceso ionorregulatorio (revisión en Towle, 1993, 1997; Towle y Weihrauch, 2001; Lucu y Towle, 2003) (Lovett et al., 2006; Torres et al., 2007; Tsai and Lin, 2007; Lucu et al., 2008). En el cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*, se ha sugerido que también las branquias anteriores estarían involucradas en la respuestas ionorregulatorias (López Mañanes et al., 2002; Elhalem, 2003; Elhalem y López Mañanes, 2004).

Las respuestas a nivel bioquímico en otros órganos y tejidos, tales como el músculo, frente a cambios en la salinidad ambiental han sido poco estudiadas. En *Cancer irroratus*, se produce una regulación del volumen celular en las fibras musculares bajo estrés hipoosmótico mediante el uso coordinado de iones inorgánicos y aminoácidos libres (Moran y Pierce, 1984). En músculo de la pata de *Eriocheir sinensis*, se producen ajustes asociados con la regulación del equilibrio ácido-base (Whiteley et al., 2001) y en músculo de *Callinectes sapidus* un incremento en el flujo de arginina quinasa (Holt and Kinsey, 2002), bajo condiciones de estrés hipoosmótico. Sin embargo, se conoce poco acerca de las respuestas de enzimas claves en músculo, probablemente involucradas en estos procesos.

En varios tejidos animales, además de la bomba clásica de sodio, se demostró la coexistencia de una actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína (segunda bomba de sodio).

En branquias del pez eurihalino *Oncorhynchus mykiss*, se sugirió el rol de la Na^+ ATPasa insensible a ouabaína en la toma activa de sal a partir del medio en condiciones hipoosmóticas (Ventrella et al., 1992; 2001). En enterocitos del pez *Sparus aurata*, la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína desempeñaría un rol en el funcionamiento de procesos de transporte activo secundario y en mecanismos osmoionorregulatorios (Dópido et al., 2004).

En túbulos de Malpighi de insectos del género *Rhodnius*, se ha sugerido el rol de la Na^+ ATPasa en la homeostasis de agua e iones (revisión en Caruso-Neves y Lopes, 2000). En los bivalvos *Tapes philippinarum* y *Mytilus galloprovincialis*, la Na^+ ATPasa participaría junto con la Na^+/K^+ ATPasa en la regulación de la concentración intracelular de Na^+ por medio del bombeo de este ión hacia el exterior celular y se ha sugerido que podría reemplazarla bajo condiciones ambientales que inhiben diferencialmente a la bomba de sodio clásica (Pagliarani et al., 1996; 2006; 2008).

La fosforilación y defosforilación de distintas proteínas constituyen mecanismos de vital importancia para la regulación de varios procesos, siendo esenciales en la comunicación de los estímulos externos a la célula produciendo cambios en las actividades y funciones de proteínas intracelulares. Los procesos de defosforilación están regulados por fosfatasa (revisión en Barford, 1999). Las fosfatasa alcalinas (AP) son enzimas ubicuas, encontradas en la mayoría de las especies, que catalizan la hidrólisis de monoésteres de fosfato de diversos sustratos (Ohkubo et al, 1974; Cyboron et al, 1982; Lau et al., 1985; Bortolato et al., 2002; Angkawidjaja et al., 2006; Muginova et al., 2007). En mamíferos, las AP han sido ampliamente estudiadas y ha sido demostrada su participación en diferentes procesos fisiológicos (revisión en Warnes, 1972; Pekarthy et al., 1972; Cyboron, 1982; Moss, 1992; Yang et al., 2000; Hessle et al., 2002; Hoemann et al., 2008; Geddes y Philpot et al., 2008).

En anfibios, se sugirió que la AP está involucrada en el transporte cutáneo de iones y de esta manera, en la osmorregulación (Dore et al., 2000). En peces, se han encontrado cambios en la actividad de AP en condiciones de estrés ambiental por frío (Majhi et al., 2006). En la trucha *Salmo gairdneri*, la respuesta de la actividad de AP en branquias e intestino frente a variaciones en la salinidad ambiental sugiere su participación en procesos osmorregulatorios (Gasser y Kirschner, 1987).

El efecto de la salinidad ambiental sobre la AP en cangrejos eurihalinos ha sido muy poco estudiado. En branquias posteriores del cangrejo eurihalino *Callinectes sapidus*, se ha demostrado la presencia de una actividad de AP sensible a baja salinidad, sugiriendo el rol de esta enzima en la modulación de la respuesta osmoionorregulatoria en este cangrejo, probablemente como efectora de los cambios en la actividad Na^+/K^+ ATPasa branquial (Lovett et al., 1992; Lovett et al, 1994).

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se demostró que *N. granulata* de la laguna de Mar Chiquita presenta flexibilidad a nivel bioquímico en branquias individuales frente a la salinidad ambiental. Así, se observaron respuestas diferenciales a salinidad reducida de actividades Na^+/K^+ ATPasa y de anhidrasa carbónica (Schleich et al., 2001; López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003). Además, demostramos la existencia en músculo de la quela de *N. granulata*, de actividad Na^+/K^+ ATPasa sensible a la salinidad ambiental. El hecho que individuos de *N. granulata* expuestos a 10 ‰ de salinidad exhiben una mayor actividad Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela que individuos mantenidos en condiciones de osmoionoconformación (35 ‰ de salinidad) sugiere el rol del músculo en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación y de esta enzima como un componente involucrado en dichos ajustes (Pinoni, 2003).

Se ha postulado como modelo general en cangrejos eurihalinos que la regulación a corto plazo frente a baja salinidad se produciría por un aumento en los niveles de dopamina (DA) que incrementaría la toma activa de iones vía la activación de la Na^+/K^+ ATPasa y que el segundo mensajero involucrado sería el AMPc (revisión en Morris, 2001; Lucu y Towle, 2003). La modulación de las enzimas claves involucradas en mecanismos de ajuste frente a cambios en la salinidad ambiental por mensajeros químicos en *N. granulata* ha sido poco estudiada. En branquias posteriores perfundidas de *N. granulata* se encontró que la dopamina (DA) puede ser tanto estimuladora como inhibitoria de la toma activa de iones

dependiendo de la condición fisiológica, y que, al menos parte de esta modulación, estaría regulada por la ruta de AMPc-PKA y protein fosfatasa (Genovese et al., 2006). En trabajos previos en nuestro laboratorio se demostró modulación tanto *in vitro* como *in vivo* de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en branquias anteriores y posteriores a DA y dbAMPc (análogo permeable a membrana del AMPc) sugiriendo el rol de DA y del AMPc en la regulación de esta enzima (Schleich, et al., 1999). Por otro lado, la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa en músculo de la quela no fue afectada *in vivo* por DA (Pinoni, 2003).

En los capítulos anteriores de la presente Tesis se demostró la coexistencia en músculo de la quela de *N. granulata* de dos actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína (Capítulo 1) además de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa previamente descrita (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 a) y de dos actividades de AP en músculo de la quela de este cangrejo: una actividad insensible y una sensible a levamisol (Capítulo 2).

Como parte del estudio integrativo de mecanismos de ajuste frente a variaciones en condiciones ambientales, se estudió:

- el efecto de salinidad ambiental reducida (10 ‰) sobre las actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata*;
- el efecto de salinidad ambiental reducida (10 y 6 ‰) sobre las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata*;
- el efecto de un cambio abrupto a salinidad reducida (de 35 a 10 ‰) sobre las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata*;
- la posible regulación por mensajeros químicos intracelulares (AMPc, GMPc y calcio) de las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* en condiciones de hiperregulación.

El estudio de las respuestas de las actividades de Na⁺ ATPasas insensible y sensible a furosemida y de AP sensible e insensible a levamisol bajo condiciones de hiperregulación contribuye a un mejor entendimiento de la complejidad de los mecanismos bioquímicos subyacentes al proceso osmorregulatorio en este cangrejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Na₂ATP (adenosin 5'-trifosfato, libre de vanadato), Tris-(hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina), levamisol (L [-]-2, 3, 5, 6-Tetrahydro-6-fenilimidazol [2,1-b] tiazol hidrocloreto), cóctel de inhibidores de proteasas (P2714), dbGMPc (dibutiril-guanosin monofosfato), dbAMPc (dibutiril-adenosin monofosfato), ouabaína (G-strofantina) y furosemida fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); pNP (p-nitrofenol), azida sódica, sacarosa, ácido clorhídrico, cloruro de magnesio y cloruro de sodio fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); sulfato de magnesio, cloruro de potasio, pNPP (p-nitrofenilfosfato) y Coomasie Blue (G250) fueron de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Se realizó según lo descrito en el Capítulo 1.

Para estudiar el efecto de la exposición a salinidad ambiental reducida sobre las actividades ATPásicas y de AP en músculo, los cangrejos se mantuvieron al menos 10 días en acuarios a 35 (agua de mar), 10 o 6 ‰ de salinidad (agua de mar diluída con agua destilada).

Para estudiar el efecto de un cambio abrupto a salinidad ambiental reducida sobre las actividades de AP en músculo, los cangrejos se mantuvieron al menos 10 días en acuarios a 35 ‰ de salinidad (t0) y luego se transfirieron abruptamente a 10 ‰ de salinidad durante 2, 4 y 24 h.

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos fueron crioanestesiados durante 20 minutos. Luego, se pesaron, se cortaron las quelas y se extrajo inmediatamente el tejido muscular de las mismas, el cual se colocó en buffer de homogeneización (Sacarosa 0,25 M / EGTA -Tris 0,5 mM, pH 7,4) (8 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Para cada preparación se trabajó con músculo de ambas quelas extraídas de un único individuo. Los homogenatos se fraccionaron y se utilizaron inmediatamente (medición de actividades ATPásicas) o se almacenaron a -20 °C con glicerol 1,3 % p/v hasta su uso (medición de proteínas y actividades de AP).

Determinación de las actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína

Las actividades Na⁺ ATPasas insensibles a ouabaína se determinaron como se describió en el Capítulo 1.

Determinación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa

La actividad ($\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+/\text{K}^+$) ATPasa (Actividad ATPásica total) se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de ATP en un medio de reacción conteniendo NaCl 100 mM, KCl 30 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl_2 10 mM, en buffer Imidazol 20 mM (pH 7,4). La actividad ($\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$) ATPasa (Actividad ATPásica Basal) se determinó en el mismo medio de reacción pero sin KCl y en presencia de 1 mM de ouabaína. La actividad Na^+/K^+ ATPasa se determinó como la diferencia entre ambos ensayos. La cantidad adecuada de proteínas (zona de linealidad de la curva de actividad versus concentración de proteínas del correspondiente homogenato) se agregó a la mezcla de reacción y se preincubó 5 min a 30° C. La reacción se inició por la adición de ATP (concentración final 13 mM). La incubación se llevó a cabo a 30° C durante 15 min. La reacción se interrumpió con el agregado de 2 ml del reactivo de Bonting (ácido sulfúrico 560 mM/ molibdato de amonio 8,1 mM y sulfato ferroso 176 mM). Luego de 20 min a temperatura ambiente se cuantificó el Pi liberado midiendo la absorbancia en 700 nm del complejo fosfomolibdato reducido (Bonting, 1970).

La actividad Na^+/K^+ ATPasa se expresó como nmoles Pi liberados $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína⁻¹. La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre el día de la preparación de los homogenatos con muestras que no fueron congeladas.

Determinación de la actividad de AP

Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol se determinaron como se describió en el Capítulo 2.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Determinación de osmolalidad y concentraciones de iones en hemolinfa

Una muestra de hemolinfa (alrededor de 500 μ l) se extrajo del seno infrabranquial por medio de una jeringa (enjuagada con anticoagulante buffer citrato de sodio pH 7,4) a partir de la base del quelípodo, se colocó en hielo (0°C) y se centrifugó a 10.000 xg (Beckman, Microfuge, B) durante 30s. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ se determinaron por fotometría de llama (Radiometer Copenhagen, FLM3). Las concentraciones de Cl⁻ se determinaron por un método colorimétrico (Kit Comercial Randox) basado en la formación de un complejo, Fe₂,4,6-tri-(2-piridil)-1.3.5-triazina-sulfato ferroso, azul. La osmolalidad se cuantificó con un microosmómetro (Radiometer, Copenhagen, 3 MO).

Estudios “in vitro” de mensajeros químicos sobre las actividades de AP en músculo de la quela

Los individuos fueron crioanestesiados durante 20 min y se extrajo el músculo de ambas quelas, se pesó, se secó y se fraccionó. Secciones de músculo (0,1 g de tejido para cada tratamiento) se incubaron a 30°C con agitación constante (velocidad 6, baño Dubnoff) en medio de incubación (buffer ácido bórico 8,8 mM/Tris pH 7,6, NaCl 330, KCl 9 mM, Mg₂Cl 10 mM, cóctel inhibidor de proteasas 0,1 % p/v) en ausencia (control) o en presencia de

dbAMPc 10^{-4} M, Ca^{2+} 3 mM o dbGMPc 10^{-4} M. A distintos tiempos luego de la incubación (15, 30, 60 y 90 min para dbAMPc y dbGMPc, y 15, 30, 60, 90 y 120 min para Ca^{2+}) se separó el tejido del medio de incubación por centrifugación a 10.000 x g durante 30 s (Beckman Microfuge B). Posteriormente, se determinaron las actividades de AP en homogenato de músculo de la quela. Cada réplica se realizó con secciones de músculo de un mismo individuo. La composición del medio de incubación utilizado contenía la concentración de los principales osmolitos de la hemolinfa de *N. granulata* expuestos a 10 ‰ de salinidad (Tabla 3.1).

Análisis de resultados experimentales

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Para el estudio de las concentraciones de iones y osmolalidad en hemolinfa, y el efecto de la salinidad sobre las actividades Na^+ ATPasas y de AP en músculo se realizó un análisis de varianza paramétrico (ANOVA de una vía) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para identificar las diferencias se utilizó un test *a posteriori* (método Holm-Sidak). Para el estudio de agentes *in vitro* sobre las actividades de AP se realizó un análisis paramétrico (t-test para muestras apareadas) o no paramétrico (Wilcoxon). Un $p < 0,05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Efecto de la salinidad sobre las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *Neohelice granulata*

Para estudiar el efecto de la salinidad sobre las actividades Na^+ ATPasa insensible a furosemida y Na^+ ATPasa sensible a furosemida en músculo de la quela los individuos se expusieron a 35 y 10 ‰ de salinidad, salinidades a las cuales *N. granulata* de la laguna de Mar Chiquita osmoionconforma e hiperregula respectivamente (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Concentraciones de iones (mEq x l^{-1}), osmolalidad (mOsm x kg^{-1}) en hemolinfa de *N. granulata* expuestos a 35, 10 y 6 ‰ de salinidad.

	35 ‰ de salinidad		10 ‰ de salinidad		6 ‰ de salinidad	
	Medio	Hemolinfa	Medio	Hemolinfa	Medio	Hemolinfa
Na^+	427,9±19,9	419,3±14,9	148,2±8,1	341±13,1*	107,0±0,2	352,0±5,6*
K^+	10,1±0,5	11,3±0,5	3,4±0,1	9,2±0,4*	2,2±0,1	10,9±1,3*
Cl^-	492,2±13,5	427,9±26,5	167,5±7,7	384,7±30,2*	92,1±0,3	280,3±4,7*
Osmolalidad	902,9±52,2	868,8±14,0	311,5±5,6	689,7±48,3*	N.D.	N.D.

* Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente concentración del medio externo. Los valores son la media ± E.S. para 4 a 9 muestras. N.D.: datos no determinados.

En individuos mantenidos a 35 ‰ de salinidad, el músculo de la quela exhibió una alta actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida ($108 \pm 15 \text{ nmoles Pi x min}^{-1} \text{ x mg prot}^{-1}$; Fig. 3.1). En 10 ‰ de salinidad, la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida fue menor (alrededor de tres veces) en individuos expuestos a salinidad reducida que en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad ($36 \pm 2 \text{ nmoles Pi x min}^{-1} \text{ x mg prot}^{-1}$) (Fig. 3.1).

La actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida en músculo de la quela de *N. granulata* expuestos a 35 ‰ de salinidad fue 15 ± 7 nmoles $\text{Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$. En individuos mantenidos a salinidad reducida esta actividad fue similar que a la correspondiente actividad a 35 ‰ de salinidad (Fig. 3.1).

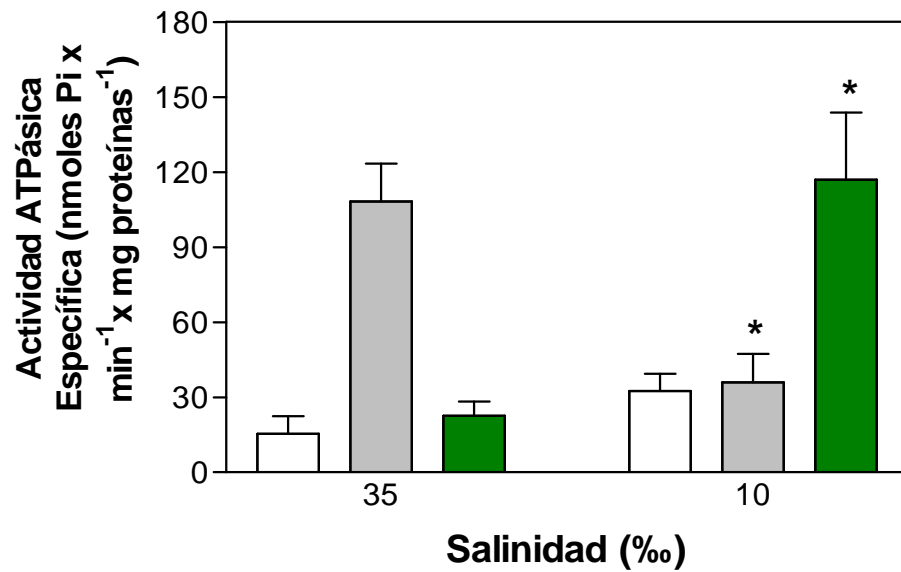


Figura 3.1. Efecto de la salinidad sobre las actividades Na^+ ATPasa insensible a furosemida (□) y Na^+ ATPasa sensible a furosemida (■) en músculo de la quela de *N. granulata*. (■) Actividad Na^+/K^+ ATPasa. Los valores son la media \pm E.S. para 5 a 9 individuos. * indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a 35 ‰ de salinidad ($p < 0,05$).

Efecto de la salinidad sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*

Para estudiar el efecto de la salinidad sobre las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol en músculo de la quela, los individuos se mantuvieron a 35 ‰ de

salinidad (condiciones de osmoionconformación), y a 10 o 6 ‰ de salinidad (condiciones de hiperregulación; Tabla 3.1).

En individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad, el músculo de la quela de *N. granulata* exhibió una alta actividad de AP insensible a levamisol (1902 ± 150 nmoles de pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹) (Fig. 3.2). En cangrejos expuestos a 10 ‰ de salinidad, la actividad de AP insensible a levamisol fue un 25 % menor (1439 ± 133 nmoles de pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹) que a 35 ‰ de salinidad. En 6 ‰ de salinidad esta actividad fue un 60 % menor (770 ± 58 nmoles de pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹) que la actividad en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad y significativamente diferente a la correspondiente actividad a 10 ‰ de salinidad (Fig. 3.2).

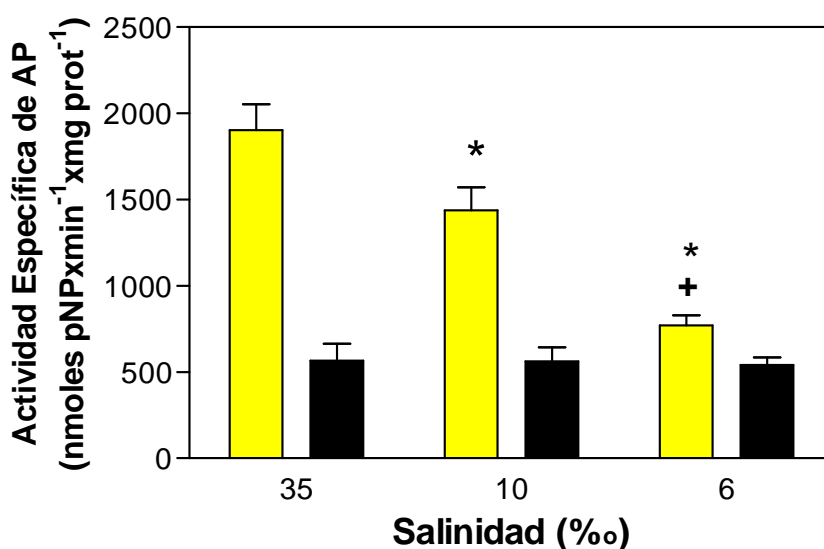


Figura 3.2. Efecto de la salinidad sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*. (■): Actividad de AP insensible a levamisol. (■): Actividad de AP sensible a levamisol. Los valores son las medias \pm E.S. de 4 a 8 individuos. * indica diferencia significativa con respecto a 35 ‰ de salinidad, ⁺ indica diferencia significativa con respecto a 10 ‰ de salinidad ($p < 0,05$).

La actividad de AP sensible a levamisol fue 557 ± 98 nmoles de pNP x min^{-1} x mg prot^{-1} en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad. Esta actividad fue similar en individuos mantenidos a salinidades reducidas (10 o 6 ‰) (Fig. 3.2).

Efecto de un cambio abrupto a salinidad ambiental reducida sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*

En una primera serie de experimentos, se estudió el efecto de un cambio abrupto de 35 a 10 ‰ de salinidad a corto plazo (2 y 4 h) sobre las actividades de AP. A estos tiempos, no se observaron cambios en las actividades de AP insensible y sensible a levamisol (datos no mostrados).

En otra serie de experimentos, se estudió el efecto a largo plazo luego del cambio abrupto a salinidad reducida. A las 24 h luego de la transferencia a 10 ‰ de salinidad la actividad de AP insensible a levamisol fue significativamente menor (alrededor de un 15 %) que la correspondiente actividad en 35 ‰ de salinidad (Fig. 3.3 A). La actividad de AP sensible a levamisol no fue afectada por el cambio de salinidad (Fig. 3.3 B).

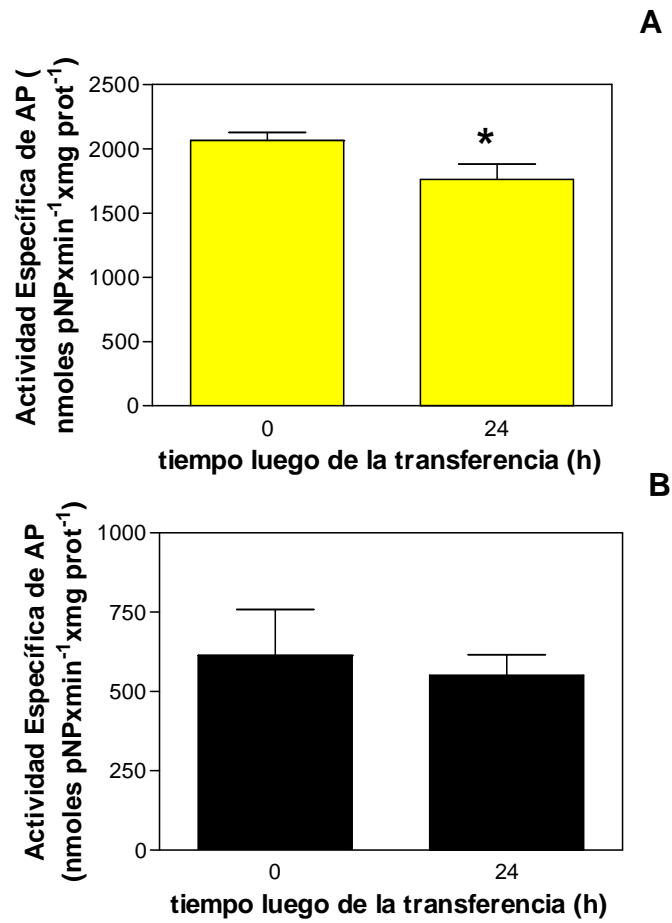


Figura 3.3. Efecto de un cambio abrupto a salinidad reducida sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en músculo de la quela de *N. granulata*. Individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad fueron transferidos abruptamente a 10 ‰ de salinidad. t0: individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad; t24: 24 h luego del cambio de salinidad. Los valores son las medias \pm E.S. para 5 individuos. * Indica significativamente diferente a la correspondiente actividad antes de la transferencia ($p < 0.05$).

Efecto de un cambio abrupto a salinidad ambiental reducida sobre las concentraciones de iones en hemolinfa de *N. granulata*

Luego de 2 h de la transferencia a 10 ‰ de salinidad, la concentración de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en hemolinfa fue similar a 35 ‰ de salinidad. Luego de 4 h de la transferencia a salinidad reducida, ocurrió una leve disminución en las concentraciones de Na⁺ y Cl⁻ en hemolinfa de *N. granulata*. A las 24 h luego de la transferencia a salinidad reducida las concentraciones de Na⁺ y Cl⁻ en hemolinfa fueron menores que a las 4 h (Fig. 3.4 A y B). La concentración de Na⁺ en hemolinfa se mantuvo constante a partir de las 24 h luego de la transferencia (Fig. 3.4 A), mientras que la concentración de Cl⁻ a los 10 días fue similar a los valores antes de la transferencia (Fig. 3.4 B). La concentración de K⁺ en hemolinfa se mantuvo constante hasta las 24 h luego del cambio abrupto a salinidad reducida. A los 10 días a 10 ‰ de salinidad, la concentración fue levemente menor a la correspondiente concentración antes de la transferencia (Fig. 3.4 C). Las concentraciones de Na⁺, Cl⁻ y K⁺ en hemolinfa se mantuvieron siempre por encima de las del medio a 10 ‰ de salinidad (Fig. 3.4). Así, *N. granulata* exhibió una capacidad hiperregulatoria, con respecto a estos iones, a corto plazo luego de un cambio abrupto a salinidad reducida.

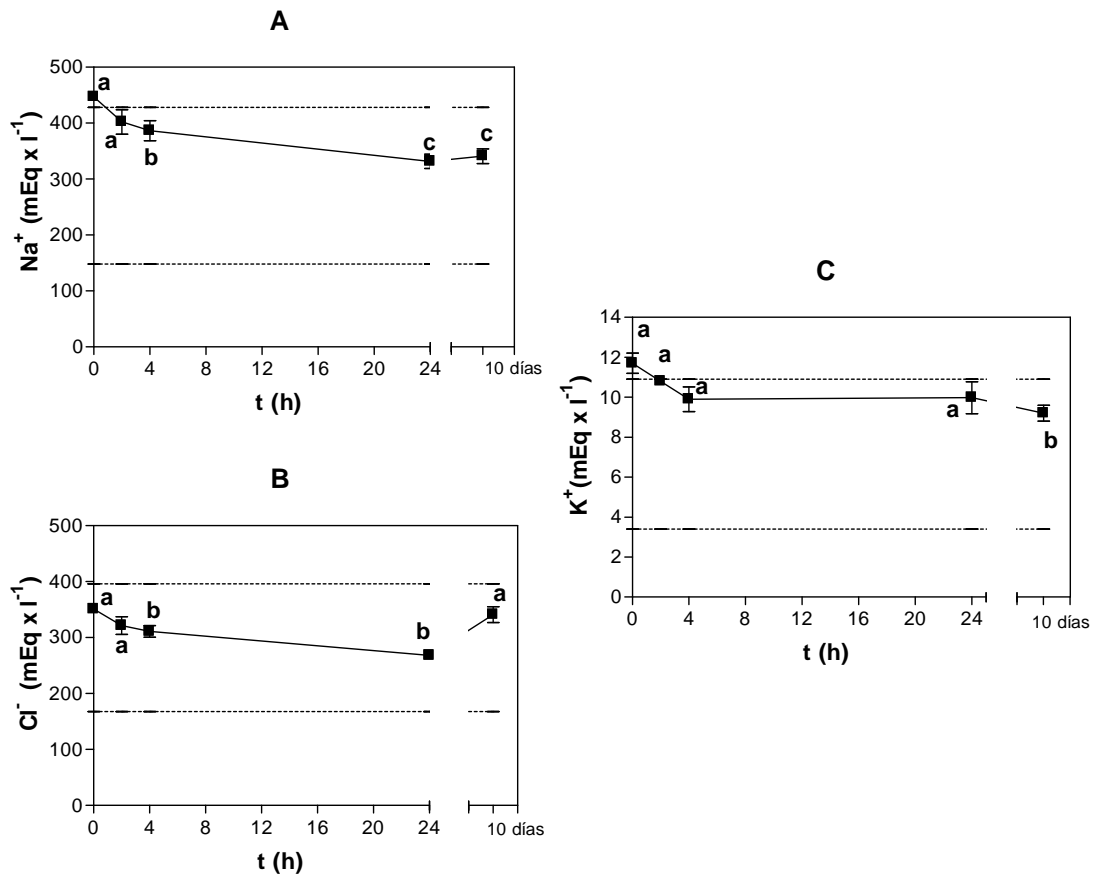


Figura 3.4. Efecto de un cambio abrupto a salinidad reducida sobre las concentraciones de iones en hemolinfa de *N. granulata*. Individuos mantenidos a 35‰ de salinidad fueron transferidos a 10‰ de salinidad. (A) Na⁺, (B) Cl⁻, (C) K⁺. Las líneas punteadas superior e inferior indican la concentración de iones en el medio a 35 y 10 ‰ de salinidad, respectivamente. Los valores son las medias ± E.S. para 4 individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

Estudios sobre el efecto “in vitro” de mensajeros químicos intracelulares sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata*

Se estudió el efecto *in vitro* de dbAMPC, dbGMPc (análogos permeables a membrana del AMPc y del GMPc respectivamente) y Ca²⁺ sobre las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* en individuos expuestos a 10 ‰

de salinidad. dbAMPc 10^{-4} M y Ca^{2+} 3 mM no afectaron las actividades de AP insensible o sensible a levamisol (datos no mostrados). dbGMPc 10^{-4} M produjo una disminución de la actividad de AP sensible a levamisol luego de 90 min de incubación (Fig. 3.5 A) mientras que la actividad de AP insensible a levamisol no fue afectada (Fig. 3.5 B).

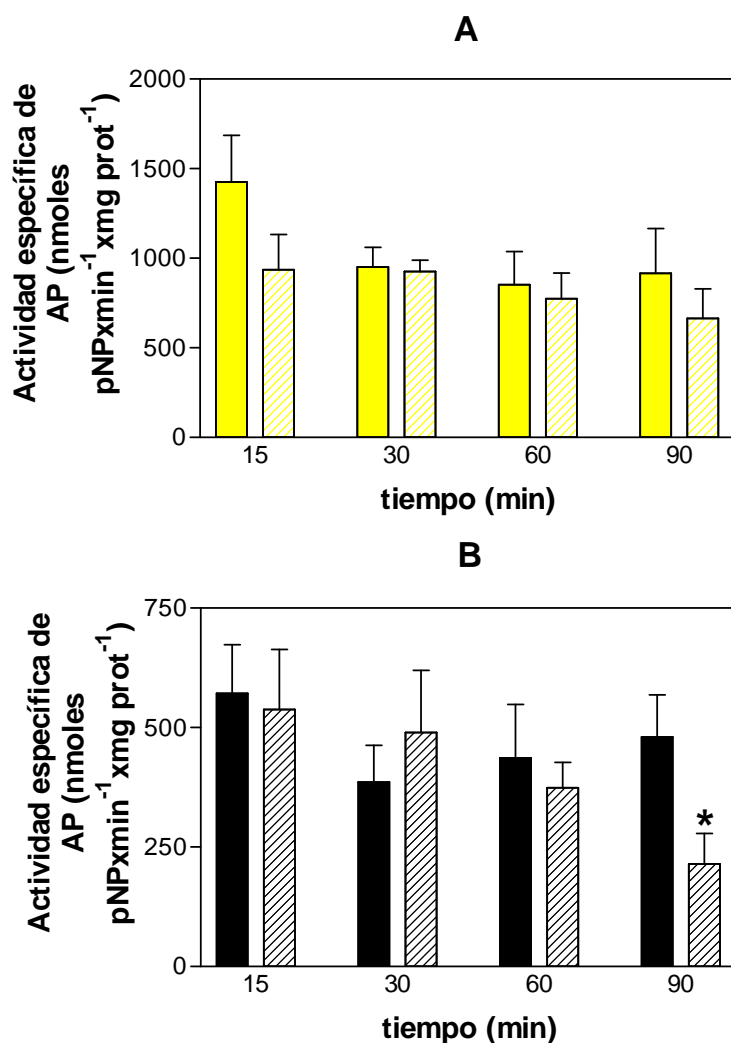


Figura 3.5. Efecto de dbGMPc 10^{-4} M sobre la actividad de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en músculo de la quela de *N. granulata*. Los valores son las medias \pm E.S. para 5 individuos. * Indica significativamente diferente con respecto al correspondiente control en ausencia de dbGMPc. Barras llenas: control; barras a rayas: dbGMPc.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran la respuesta diferencial a salinidad ambiental de las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína y de las actividades de AP en músculo de la quela de *Neohelice granulata* de la laguna de Mar Chiquita.

Las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata* exhibieron una respuesta diferente de la coexistente actividad Na^+/K^+ ATPasa (Fig. 3.1). A diferencia de la actividad Na^+/K^+ ATPasa, la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida fue alta en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad. Así, la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida parece ser predominante en condiciones de osmoionconformación (Fig. 3.1). Esto concuerda con lo observado en branquias del mejillón *Mytilus edulis*, en el cual, la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína fue mayor que la coexistente Na^+/K^+ ATPasa (Howland y Faus, 1985). La menor actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida en músculo de la quela de individuos expuestos a baja salinidad (10 ‰) junto con el incremento de la actividad Na^+/K^+ ATPasa sugieren que una regulación coordinada de ambas actividades podría constituir una de las respuestas secundarias a la hiperregulación en *N. granulata*. La respuesta antagónica de ambas actividades a la salinidad ambiental podría sugerir un diferente rol fisiológico de las mismas bajo condiciones de hiperregulación y osmoconformación. La Na^+ ATPasa sensible a furosemida podría tener un rol de mantenimiento, en condiciones de osmoionconformación, del gradiente de Na^+ necesario para la actividad de sistemas de transporte dependientes de este ión involucrados en funciones celulares esenciales (por ej., mantenimiento del pH y volumen celular). En mamíferos, se ha sugerido un rol de la Na^+ ATPasa insensible a ouabaína en la reabsorción de Na^+ en riñón (revisión en Caruso-Neves et al., 2001), en la regulación del volumen celular en riñón y sarcolema cardíaco (Proverbio et al., 1991; Camejo et al., 1995), en el transporte

transepitelial de sodio en intestino (del Castillo et al., 2005) y en la regulación del balance de sodio y presión sanguínea (Beltowski et al., 2004). En estudios *in vitro* en músculo de la mandíbula de *N. granulata*, se ha observado que la toma activa de aminoácidos dependiente de sodio, bajo condiciones de estrés hiperosmótico, no es afectada por ouabaína (Schein et al., 2005 a). Si la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida encontrada en músculo de la quela de *N. granulata* está involucrada en este proceso requiere mayor investigación.

El músculo de cangrejos eurihalinos ha sido involucrado en la regulación de volumen celular (Lang y Gaener, 1969; Moran y Pierce, 1984), balance ácido base (Whiteley et al., 2001), así como también fuente de energía para la movilización de lípidos (Luvizotto-Santos et al., 2003) bajo estrés hipoosmótico. En salinidad reducida, cuando la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida es baja, la Na^+/K^+ ATPasa podría desempeñar el rol principal en el mantenimiento del gradiente de Na^+ necesario para el funcionamiento de sistemas de transporte probablemente involucrados en estos procesos secundarios a la hiperregulación.

En diferentes órganos de vertebrados e invertebrados, también se encontró una respuesta diferente a las condiciones ambientales de las coexistentes actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasa insensible a ouabaína. En branquias de la trucha *Oncorhynchus mykiss*, ambas actividades son afectadas diferencialmente por la salinidad ambiental, y se sugirió el rol prevalente de la Na^+ ATPasa insensible a ouabaína en condiciones hipoosmóticas (Ventrella et al., 1992; 2001). En túbulos de Malpighi del insecto *Rhodnius neglectus*, la actividad Na^+/K^+ ATPasa es inhibida durante la exposición a un medio hiperosmótico, mientras que la actividad Na^+ ATPasa insensible a ouabaína no es afectada en estas condiciones (revisión en Caruso-Neves y Lopes, 2000). En branquias y manto de bivalvos, las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasa insensible a ouabaína son diferencialmente afectadas por químicos exógenos (Pagliarani et al., 2006) y por la exposición a amonio-nitrógeno (Pagliarani et al., 2008).

Si los cambios en las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata* en respuesta a la salinidad ambiental implica la modulación de enzimas preexistentes (por ej., por variaciones en la concentración intracelular de Na^+ , activación/inhibición por mensajeros químicos, cambios en la composición fosfolipídica de membrana plasmática) o síntesis/degradación de proteínas requiere mayor investigación. Más aún, las respuestas diferenciales de estas actividades a la salinidad podrían relacionarse con una distinta sensibilidad de las mismas a dichos mecanismos de regulación.

El rol de AP en la respuesta a salinidad ambiental en cangrejos eurihalinos ha sido poco estudiado. En branquias posteriores del cangrejo eurihalino *Carcinus maenas*, se observó una disminución en la actividad de AP luego de la aclimatación a salinidad reducida. En base a la respuesta antagónica de las actividades Na^+/K^+ ATPasa y de AP estos autores sugirieron que la AP podría ser un efector de los cambios en la actividad Na^+/K^+ ATPasa branquial (Lovett et al., 1994). La actividad de AP podría estar involucrada en la regulación de la síntesis o transporte de poliaminas las cuales son moduladores de la Na^+/K^+ ATPasa (Lovett et al., 1992; 1994).

La menor actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* luego de la exposición a salinidades reducidas (10 y 6 ‰), salinidades a las cuales este cangrejo se comporta como hiperregulador (Tabla 3.1), sugiere que la AP insensible a levamisol podría ser un componente de mecanismos de ajuste asociados a la hiperregulación. La respuesta antagónica a la salinidad ambiental encontrada entre la actividad de AP insensible a levamisol (Fig. 3.2) y la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Fig. 3.1) en músculo de la quela de *N. granulata* podría sugerir una relación fisiológica entre ambas actividades como fue sugerido para branquias de *C. sapidus* (Lovett et al., 1994). Por otro lado, el hecho de que la actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la quela fue menor en 6 ‰ que en 10 ‰

de salinidad sugiere que la respuesta de esta actividad es dependiente del grado de estrés salino (Fig. 3.2). Más aún, el hecho que *N. granulata* exhibió una capacidad hiperregulatoria similar con respecto al Na^+ , Cl^- y K^+ en hemolinfa en 10 y 6 ‰ de salinidad, sugiere que la diferencia en la actividad de AP insensible a levamisol en estas salinidades podría constituir un ajuste secundario relacionado con el mantenimiento de la capacidad hiperregulatoria en un amplio margen de salinidad reducida. Para otros cangrejos hiperreguladores se ha sugerido una correlación entre la actividad y/o expresión de la Na^+/K^+ ATPasa branquial y el grado de adaptación al gradiente de salinidad al que son expuestos (Torres et al., 2007; revisión en Freire et al., 2008).

Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que en branquias individuales posteriores (7 y 8) de *N. granulata* de la laguna de Mar Chiquita ocurre un aumento de la actividad Na^+/K^+ ATPasa luego de 4 h del cambio abrupto de 35 a 10 ‰ de salinidad, mostrando la activación a corto plazo de mecanismos hiperregulatorios en este cangrejo (Schleich et al., 2001). Los resultados de la presente Tesis muestran que *N. granulata* de la laguna de Mar Chiquita exhibe una fuerte capacidad hiperregulatoria luego de 2 h de un cambio abrupto de 35 a 10 ‰ de salinidad (Fig. 3.4). En este contexto, la disminución de la actividad de AP insensible a levamisol luego de 24 h de un cambio abrupto a salinidad reducida (Fig. 3.3) sugiere que el músculo y esta actividad podrían estar involucrados en ajustes a corto plazo, posteriores y secundarios a la activación de la maquinaria hiperregulatoria branquial.

La actividad de AP insensible a levamisol podría tener un rol en procesos de regulación por defosforilación/fosforilación de distintos componentes (por ej. proteínas de transporte) posiblemente involucrados en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación en músculo. Así, por ejemplo, en varios tejidos animales se ha descrito que la Na^+/K^+ ATPasa y otros sistemas de transporte involucrados en el mantenimiento del medio interno son

regulados por procesos de fosforilación/defosforilación (revisión en Ewart y Klip, 1995; Therien y Blostein, 2000; Morris, 2001; Mc Mullen et al., 2008).

La respuesta a corto plazo de la actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la quela luego de un cambio abrupto a salinidad reducida (Fig. 3.3) sugiere la regulación de esta actividad por mensajeros químicos. En *N. granulata*, se ha demostrado que distintas aminas biogénicas (DA, serotonina, octopamina) afectan el transporte de iones y la Na^+/K^+ ATPasa branquial vía la ruta del AMPc sugiriendo el rol de este mensajero químico intracelular en la modulación del proceso de hiperregulación (Schleich et al., 1999; Morris, 2001; Elhalem y López Mañanes, 2003; Genovese et al., 2006; Lucu et al., 2008). En el cangrejo *Carcinus maenas*, un estrés hipoosmótico produce un incremento en los niveles de la CHH (hormona hiperglicemiante de crustáceos), la cual parece estar acoplada a la vía de trasducción de señales del GMPc en branquias y hepatopáncreas, sugiriendo un posible rol osmoionorregulatorio de esta hormona y de este segundo mensajero (Chung y Webster, 2006). En crustáceos, el Ca^{2+} ha sido implicado también como segundo mensajero inducido por la CHH el cual estimula la formación de AMPc y GMPc (Smullen et al., 1996). dbAMPc (10^{-4} M) o Ca^{2+} 3 mM *in vitro* no afectaron las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata*. Por otro lado, la actividad de AP sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* fue inhibida por dbGMPc (Fig. 3.5) sugiriendo la regulación diferencial de esta actividad por la vía del GMPc. Se necesitan más estudios para conocer la implicancia fisiológica de la regulación de la actividad de AP sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata* por GMPc en condiciones de hiperregulación y cuál es el mensajero químico primario que la desencadena. La ausencia de efecto encontrada por parte de AMPc, GMPc y Ca^{2+} sobre la actividad de AP insensible a levamisol sugiere que los incrementos de esta actividad en condiciones de salinidad reducida no serían regulados por las rutas de trasducción de señales de los mismos. Sin embargo, se requieren más estudios (por ej.

curvas dosis respuesta, estudios *in vivo*, estudios en condiciones de osmoconformación) antes de descartar la participación de estos mensajeros intracelulares en la regulación de la actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata*.

En conclusión, el músculo de la quela de *N. granulata* presenta una actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida y una actividad de AP insensible a levamisol que disminuyen a salinidad reducida. La hiperregulación requeriría una reorganización a nivel bioquímico que en músculo implica la respuesta de actividad de enzimas clave (Na^+/K^+ ATPasa, Na^+ ATPasa sensible a furosemida, AP insensible a levamisol) posiblemente involucradas en mecanismos de ajuste secundarios a este proceso (por ej., regulación del volumen celular, equilibrio ácido base, movilización de sustratos de energía). Por otro lado, la respuesta diferencial de las actividades enzimáticas estudiadas sugiere un alto grado de flexibilidad a nivel bioquímico de este cangrejo lo que le permitiría hacer frente a las variaciones en la salinidad ambiental que ocurren en su ambiente natural. Futuros estudios deberán focalizarse en establecer el exacto rol fisiológico de estas actividades de músculo en la respuesta integrativa a variaciones en las condiciones ambientales y/o fisiológicas de *N. granulata* y así permitir un mejor conocimiento de los múltiples mecanismos de ajuste subyacentes al mantenimiento del medio interno de este cangrejo.

CAPÍTULO 4:

ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA Y

PROTEOLÍTICA EN HEPATOPÁNCREAS DE

***Neohelice granulata*: RESPUESTAS A SALINIDAD**

INTRODUCCIÓN

Para hacer frente a cambios temporales en las demandas de energía disparados por variaciones en las condiciones externas y/o internas los organismos deben presentar estrategias a distintos niveles que permitan el ajuste del presupuesto energético. Los procesos de digestión y absorción del alimento constituyen restricciones que limitan la tasa de asimilación de nutrientes y el presupuesto energético de los organismos (Bozinovic, 2003, Sabat et al., 1999; Caviedes-Vidal et al., 2000; Balslev-Clausen et al., 2003; del Valle et al., 2004; 2006). La modificación de la capacidad digestiva constituye uno de los mecanismos de ajuste mediante el cual los organismos responden a cambios en las condiciones externas o internas que impliquen una demanda incrementada de energía (Naya et al., 2007). En vertebrados, se ha demostrado que la capacidad digestiva puede ser incrementada en respuesta a distintos tipos de estrés a través de cambios en el tamaño de los órganos digestivos, variaciones en la actividad de enzimas digestivas y/o mecanismos de transporte de nutrientes. La actividad de enzimas digestivas constituye uno de los factores claves que afecta la capacidad digestiva de los organismos. En varios vertebrados, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas (ej. proteasas) constituye una importante respuesta a nivel bioquímico que permitiría incrementar la tasa de asimilación y, en consecuencia, el nivel de ganancia y utilización de energía (Caviedes-Vidal et al., 2000; del Valle et al., 2004; 2006; Naya et al., 2007; del Valle y López Mañanes, 2008). Otras enzimas claves en este proceso serían distintas fosfatasas alcalinas (AP), las cuales participan en el mantenimiento de diversas funciones esenciales del tracto digestivo de vertebrados (revisión en Warnes, 1972; Moss, 1992; Akiba et al., 2007; Hansen et al., 2007; Geddes y Philpot et al., 2008; Goldberg et al., 2008). En mamíferos, las AP de tracto digestivo participan en diversas funciones, tales como la digestión y la absorción de lípidos (Mahmood et al., 2003; Hansen et al., 2007),

hidrólisis de fosfatos orgánicos de la dieta (Akiba et al., 2007) y detoxificación en intestino (Goldberg et al., 2008; revisión en Geddes y Philpott, 2008). Las proteasas o enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas y facilitan la digestión de proteínas provenientes de la dieta (revisión en García Carreño, 1993, Hara et al., 2000)

El hepatopáncreas o glándula digestiva de crustáceos secreta grandes cantidades de enzimas digestivas. Las enzimas presentes en el jugo gástrico son sintetizadas en el hepatopáncreas y secretadas posteriormente hacia la cámara gástrica (Dall y Moriarty 1983; Icely y Nott 1992; McGaw y Reiber 2000). Además de su rol en la síntesis y secreción de enzimas digestivas, el hepatopáncreas de crustáceos cumple diversas funciones tales como absorción de productos dietarios digeridos, metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, distribución de reservas almacenadas durante los períodos de intermuda y catabolismo de compuestos orgánicos (revisión en Ceccaldi, 1989; Lovett y Felder, 1990b; Rosas et al., 1995; Ceccaldi, 1997; Lavarías et al., 2006; 2007; Hu y Leung, 2007).

En varios crustáceos se demostró la existencia de actividad de AP en hepatopáncreas (Momin y Ragnekeer, 1974; Barker y Gibson, 1977; Olsen et al., 1991; Vijayavel y Balabramanian, 2006). Sin embargo, su exacto rol fisiológico no ha sido aún determinado. En *Homarus gammarus*, se ha demostrado que la AP es una de las enzimas liberadas a partir del hepatopáncreas durante el proceso de digestión (Barker y Gibson, 1977).

El hepatopáncreas de crustáceos decápodos sintetiza enzimas proteolíticas altamente activas (Van Wormhoudt, 1980; Lovett y Felder, 1990 b; García-Carreño, 1992; García-Carreño et al., 1994; Navarrete del Toro et al., 2006; revisión en Muhlia-Almazán et al., 2008) que son liberadas hacia el estómago cardíaco donde facilitan el primer paso en la hidrólisis de los péptidos provenientes de la dieta (Barker y Gibson, 1977; Díaz Tenorio et al., 2006; Navarrete del Toro et al., 2006). Así, la digestión proteica comienza en la cámara gástrica con enzimas del hepatopáncreas.

En crustáceos, es conocida la regulación de enzimas digestivas por la dieta, los ritmos cronobiológicos, durante el desarrollo ontogénico y durante la muda (van Wormhoudt et al., 1980; Lovett y Felder, 1990 a, b; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002; Muhlia-Almazán et al., 2003; Saborowski, et al., 2006; Perera et al., 2008). Sin embargo son escasos los estudios sobre el efecto de otros factores ambientales tales como la salinidad ambiental. En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se ha observado la existencia de actividad de tripsina sensible a salinidad ambiental (Li et al., 2008).

En salinidad reducida, los cangrejos hiperreguladores absorben activamente Na^+ y Cl^- desde el medio externo a través de las branquias para compensar la pérdida de sales, en un proceso con alto costo de energía (revisión en Lucu y Towle, 2003; Kirschner, 2004; Normant y Gibowicz; 2008). En los cangrejos eurihalinos *Rhithropanopeus harrisi* y del género *Callinectes* se ha demostrado que la hiperregulación involucra ajustes en la tasa metabólica y en la actividad de enzimas implicadas en la generación de ATP en las branquias (Kinsey et al., 2003; Stickle et al., 2007; Normant y Gibowicz, 2008). Así, la hiperregulación requiere una reorganización metabólica para soportar las demandas aumentadas de energía asociadas con la activación de la maquinaria osmoionorregulatoria. Sin embargo, faltan estudios sobre mecanismos de ajustes digestivos, particularmente a nivel bioquímico, que permitirían ajustes en la eficiencia digestiva, y de esta manera en el presupuesto energético, para hacer frente a las demandas incrementadas de energía asociadas a la hiperregulación. En este contexto, no se han realizado aún estudios sobre el efecto de la salinidad ambiental sobre la actividad de enzimas digestivas en hepatopáncreas en condiciones osmorregulatorias diferenciales (ej. hiperregulación, osmoconformación). Más aún, faltan estudios de localización y caracterización de enzimas digestivas presentes en hepatopáncreas de cangrejos osmorreguladores.

Debido a la importancia del mecanismo de hiperregulación para la supervivencia e historia de vida del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata* se han realizado diversos estudios para determinar los componentes implicados en el transporte activo de iones en branquias. Así, se han realizado estudios sobre sistemas de transporte y enzimas branquiales involucrados en respuestas a baja salinidad (Schleich et al., 2001; Luquet et al., 2005; Genovese et al., 2006; Tresguerres et al., 2008; revisión en Bianchini et al., 2008). Sin embargo, están poco comprendidos aún los mecanismos de ajuste a nivel bioquímico en respuesta a salinidad ambiental en otros órganos y tejidos (ej, hepatopáncreas). En individuos de *N. granulata* de la laguna Tramandaí (Rio Grande do Sul, Brasil) la gluconeogénesis en el hepatopáncreas constituiría una de las rutas metabólicas implicadas en el ajuste del pool de aminoácidos durante un estrés hipoosmótico (Oliveira y da Silva, 2000). Estudios *in vitro* con secciones de hepatopáncreas demostraron la existencia de ajustes asociados a la gluconeogénesis en respuesta a estrés hipoosmótico (Oliveira et al., 2000; Schein et al., 2005 a) y de un incremento de osmolitos orgánicos en repuesta a estrés hiperosmótico (Jahn et al., 2006). Sin embargo, faltan estudios de localización, caracterización y regulación de actividades enzimáticas posiblemente involucradas en estos procesos tales como AP y proteasas. Más aún, para nuestro conocimiento, no se han realizado estudios sobre el efecto de la salinidad sobre enzimas digestivas en hepatopáncreas de *N. granulata*.

N. granulata de la zona de planicie de mareas exhibe una fuerte capacidad hiperregulatoria en condiciones de salinidad reducida (Schleich et al., 2001; Capítulo 3, presente Tesis). Paralelamente a la hiperregulación, hemos demostrado que este cangrejo exhibe incrementos diferenciales a corto y largo plazo en la actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias anteriores (4 y 5) y posteriores (7 y 8) (Schleich et al., 2001) y una mayor actividad de esta enzima en músculo de la quela (Pinoni, 2003). Además, hemos demostrado la respuesta de actividades Na^+ ATPasa sensible a furosemida y de AP insensible a levamisol

en músculo de la quela a salinidad reducida (Capítulo 3, presente Tesis). La respuesta a salinidad reducida de la Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales y de las actividades de Na^+/K^+ ATPasa, Na^+ ATPasa sensible a furosemida y de AP insensible a levamisol en músculo de la quela sugiere la existencia de mecanismos de ajustes coordinados a nivel bioquímico en *N. granulata* asociados a la hiperregulación, que, además, podrían implicar demandas diferenciales de energía (ej. cambios en la actividad de ATPasas).

En este capítulo se describen los estudios realizados para determinar:

- la existencia de actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*
- el efecto de la baja salinidad ambiental sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*.
- el efecto de la baja salinidad ambiental sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* a distintos tiempos luego de la ingesta de alimento

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Tris-(hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina), levamisol (L [-]-2, 3, 5, 6-Tetrahidro-6-fenilimidazol [2,1-b] tiazol hidrocloreto) y azocaseína fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); pNP (p-nitrofenol), ácido clorhídrico, cloruro de magnesio y cloruro de sodio fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); sulfato de magnesio, cloruro de potasio, Coomassie Blue G250 y pNPP (p-

nitrofenilfosfato) fueron de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Se realizó según lo descrito en el Capítulo 1.

Para determinar las actividades enzimáticas en hepatopáncreas a distintos tiempos luego de la ingesta de alimento, individuos mantenidos al menos 10 días a 35 o 10 ‰ de salinidad, fueron privados de alimento por 5 días ($t=0$), de manera de asegurar la restitución de las enzimas digestivas en hepatopáncreas luego de la ingesta de alimento (Ceccaldi, 1989; McGaw 2007). Posteriormente, fueron alimentados individualmente. A los tiempos indicados en los correspondientes experimentos, los individuos fueron crioadestesiados para preparar extractos enzimáticos de hepatopáncreas como se describe a continuación.

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos se crioadestesiaron durante 20 minutos, se pesaron y posteriormente, se removió el caparazón y se extrajo el hepatopáncreas. El hepatopáncreas se colocó en buffer (Tris 100 mM /HCl pH 7,4; 4 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min (Sorval, rotor SS34). Se separó el sobrenadante el cual se fraccionó en alícuotas, se agregó glicerol (1,3% v/v) y almacenó a -20° C hasta su uso.

Determinación de la actividad de AP

La actividad de AP se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de pNPP en un medio conteniendo SO_4Mg 4 mM en buffer Tris 100 mM / HCl pH 7,7 y 8,5 en ausencia (actividad de AP total) y en presencia de levamisol 16 mM (actividad de AP insensible a levamisol). La actividad de AP sensible a levamisol fue estimada como la diferencia entre ambos ensayos.

La cantidad adecuada de proteínas, entre 7 y 80 μg (zona de linealidad de la curva de actividad versus concentración de proteínas del correspondiente sobrenadante de hepatopáncreas) se agregó a la mezcla de reacción y se preincubó 5 minutos a 37° C. La reacción de fosfatasa se inició por la adición de pNPP (concentración final 9,5 mM). La incubación se realizó a 37° C durante 15 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de 2 ml de KOH 0,1 M. El pNP liberado se cuantificó por medición de la absorbancia en 410 nm.

Para los estudios de caracterización, la actividad de AP se ensayó como se describió anteriormente pero a diferentes niveles de pH del medio de reacción según se indica para cada experimento. Se utilizaron individuos mantenidos a 35 ‰ de salinidad ayunados por 48 h para estos experimentos.

La actividad de AP se expresó como $\mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre con muestras que no fueron previamente descongeladas. El congelado de las muestras no alteró los valores de actividad.

Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de azocaseína en buffer Tris 100 mM / HCl (pH 7,5). La cantidad adecuada de proteínas entre 70 y 250 µg (zona de linealidad de la curva de actividad versus concentración de proteínas del correspondiente sobrenadante de hepatopáncreas) se agregó a la mezcla de reacción. La reacción se inició por la adición del sustrato azocaseína (concentración final 1 % p/v). La incubación se realizó a 45° C durante 30 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de TCA frío (10 % p/v). Se dejó en frío y luego se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 20 min. (IEC-Centra 7R, refrigerada). La azocaseína degradada se cuantificó en el sobrenadante por medición de la absorbancia en 440 nm.

La actividad se expresó como unidades de enzima (U) x h⁻¹ x mg prot⁻¹. Una U fue definida arbitrariamente como la cantidad de extracto enzimático que produjo un incremento de 1 en la absorbancia en 440 nm.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre con muestras que no fueron previamente descongeladas. El congelado de las muestras no alteró los valores de actividad.

Preparación de extractos de branquias

Los cangrejos se crioanestesiaron durante 20 minutos, se pesaron y posteriormente, se removió el caparazón y se extrajeron las branquias anteriores (pares 1 a 5), branquias posteriores (pares 6 a 8) y músculo de ambas quelas. Las branquias se colocaron en buffer de homogeneización (Sacarosa 0,25 M / EGTA -Tris 0,5 mM, pH 7,4) (4 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizaron en hielo con 25 golpes en homogeneizador de vidrio-teflón

(Potter - Elvehjem) a $1.700 \text{ rev. x min}^{-1}$. Posteriormente, se centrifugó durante 2 min a 3.000 r.p.m. (IEC-Centra 7R, refrigerada) y se utilizó el sobrenadante para la determinación de proteínas y glucógeno.

Preparación de extractos de músculo

El extracto de músculo de la quela se preparó como se describió en el Capítulo 1 de la presente Tesis.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Determinación de la concentración de glucosa en hemolinfa

Una muestra de hemolinfa (alrededor de 500 μl) se extrajo del seno infrabranquial por medio de una jeringa (enjuagada con anticoagulante buffer citrato de sodio pH 7,4) a partir de la base del quelípodo, se colocó en hielo (0°C) y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 3 min (IEC-Centra 7R, refrigerada). La glucosa se determinó mediante el método colorimétrico de la glucosa oxidasa (Kit comercial de glicemia Wiener Lab AA).

Determinación de glucógeno en branquias

El contenido de glucógeno se determinó según Robaldo et al. (1999). La correspondiente muestra se incubó en ausencia y en presencia de $0,2 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de α -amiloglucosidasa durante 2 h a 30°C . Luego de la incubación se determinó colorimétricamente la concentración de glucosa mediante el Kit enzimático de glicemia de Wiener-Lab. AA. La concentración de glucógeno se calculó como la diferencia entre ambos tratamientos.

Análisis de resultados experimentales

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se utilizó un análisis de varianza paramétrico (ANOVA de una vía) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para el estudio del efecto del pH sobre las actividades de AP en hepatopáncreas se utilizó RM-ANOVA. Para identificar diferencias se utilizó un test *a posteriori* ANOVA (método Holm-Sidak) o Kruskal-Wallis (método de Dunn o test Turkey) y un $p < 0,05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Actividad de AP en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*: respuesta a pH y levamisol

Preliminarmente, se determinó el efecto del pH (rango entre 7,0 y 9,0) sobre la actividad de AP total en hepatopáncreas de *N. granulata* encontrándose la mayor actividad a

pH 8,5 (datos no mostrados). Posteriormente, se determinó la actividad de AP en hepatopáncreas a pH 8,5 en ausencia y en presencia de levamisol 16 mM (concentración a la que se obtuvo la máxima inhibición de la actividad de AP sensible a levamisol en músculo, Capítulo 2). La inhibición por levamisol reveló la presencia de una actividad sensible a levamisol y una actividad insensible a levamisol en hepatopáncreas de *N. granulata* (Fig. 4.1).

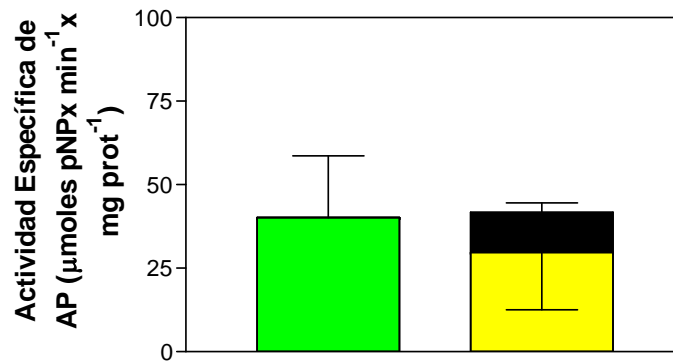


Figura 4.1. Actividades de AP total (■), insensible a levamisol (■) y sensible a levamisol (■) en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad se midió en ausencia y en presencia de levamisol 16 mM. Los datos son la media \pm E.S. para 3 a 4 individuos.

Ambas actividades exhibieron una respuesta diferencial al pH. La actividad de AP insensible a levamisol fue similar dentro del rango de pH de 7,4 a 9,0 (Fig. 4.2 A). La actividad de AP sensible a levamisol fue marcadamente sensible al pH. Esta actividad fue baja dentro del rango de pH de 7,4 a 8,0. La actividad máxima se obtuvo a pH 8,5. A pH 9,0 esta actividad disminuyó alrededor de un 25 % (Fig. 4.2 B). Para los siguientes experimentos, las actividades de AP se determinaron a pH 7,7 (insensible a levamisol) y 8,5 (sensible a levamisol).

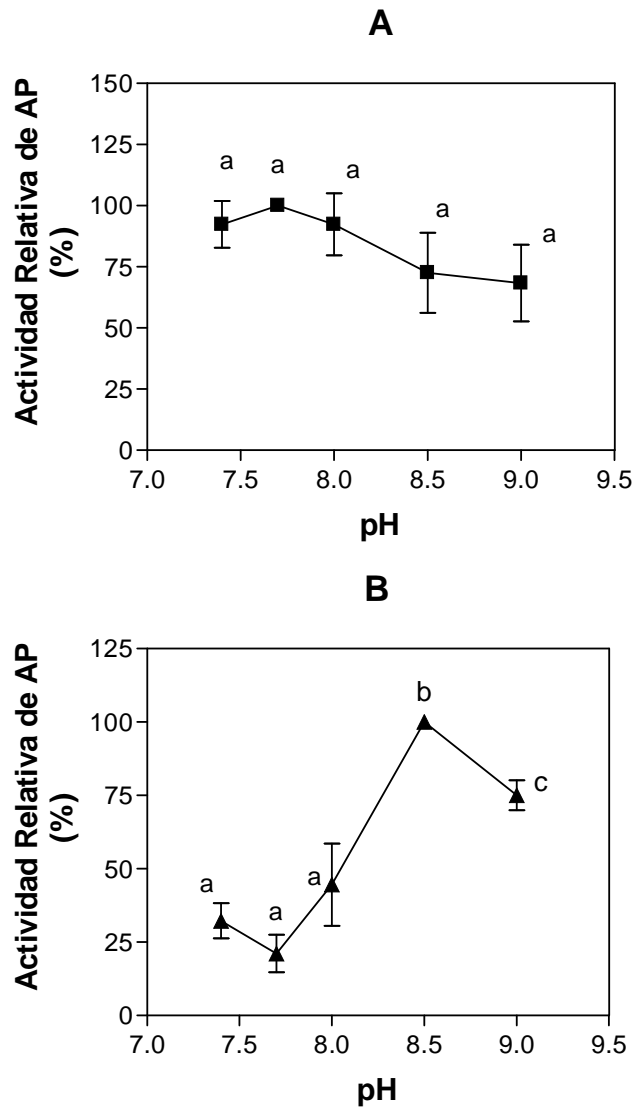


Figura 4.2. Efecto del pH sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en hepatopáncreas de *N. granulata*. La actividad específica a pH 7,7 (actividad de AP insensible a levamisol) o 8,5 (actividad de AP sensible a levamisol) se tomó como el 100 %. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 3 individuos.

Actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* expuestos a diferentes condiciones de salinidad ambiental

En experimentos iniciales, se determinaron las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* expuestos a 35 y 10 ‰ de salinidad, salinidades en las cuales este cangrejo osmoionconforma e hiperregula, respectivamente (Capítulo 3, presente Tesis) y privados de alimento por 48 h.

En individuos mantenidos a 35 ‰ de salinidad, el hepatopáncreas exhibió una alta actividad de AP insensible y sensible a levamisol ($21,8 \pm 9$ y $7,7 \pm 2,3$ $\mu\text{moles de pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) (Fig. 4.3). Las actividades de AP en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* expuestos a 10 ‰ de salinidad no presentaron diferencias significativas con la correspondiente actividad en 35 ‰ de salinidad. Sin embargo, se encontró una mucho mayor dispersión en los valores de actividad en condiciones de salinidad reducida (Fig. 4.3).

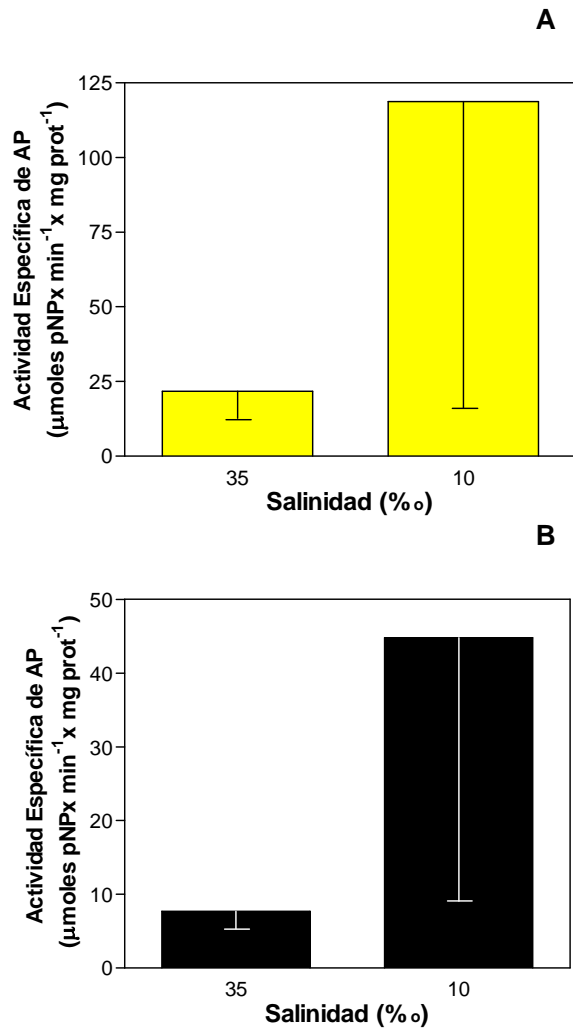


Figura 4.3. Actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos a 35 y 10 ‰ de salinidad. Los valores son la media ± E.S. para 6 individuos.

La actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* fue similar en individuos mantenidos a 35 y 10 ‰ de salinidad ($3,6 \pm 1,0$ y $5,3 \pm 0,8$ U x h⁻¹ x mg prot⁻¹ respectivamente) (Fig. 4.4).

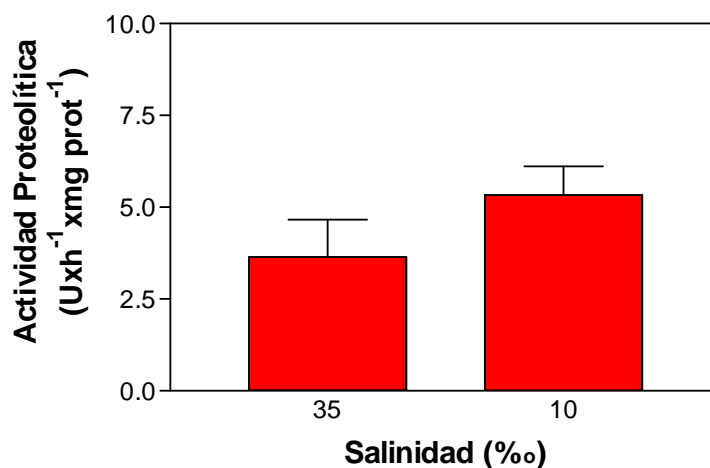


Figura 4.4. Actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos a 35 y 10 ‰ de salinidad. Los valores son la media ± E.S. para 5-6 individuos.

Paralelamente, se determinó la concentración de glucosa en hemolinfa. La concentración de glucosa en hemolinfa de individuos mantenidos a 35 y 10 ‰ de salinidad fue similar ($107,6 \pm 16,1$ µg x ml⁻¹ y $98,5 \pm 15,3$ µg x ml⁻¹, respectivamente).

Efecto de la exposición a baja salinidad sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de N. granulata a distintos tiempos luego de la ingesta

En una serie de experimentos, se determinaron las actividades de AP insensible y sensible a levamisol (Fig. 4.5), y proteolítica (Fig. 4.6) en hepatopáncreas antes y a tiempos

cortos luego de la ingesta de alimento (2-4 h) en condiciones de osmoionorregulación (35 ‰ de salinidad) e hiperregulación (10 ‰ de salinidad).

En individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad, las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en hepatopáncreas, no fueron diferentes antes y luego de 2 y 4 h de la ingesta de alimento (Fig. 4.5 A).

En 10 ‰ de salinidad, las actividades de AP insensible y sensible a levamisol fueron menores luego de 2 h de la ingesta de alimento (insensible a levamisol: t=0: $682,3 \pm 347,4$; t=2h: $39 \pm 19,8 \mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$; sensible a levamisol: t=0: $210,4 \pm 114,9$; t=4h: $3,5 \pm 1,8 \mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) (Fig. 4.5 B). Además, las actividades de AP antes de la ingesta (individuos privados de alimento durante 5 días) en hepatopáncreas de individuos expuestos a 10 ‰ de salinidad fueron mayores que la correspondiente actividad en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad (Fig. 4.5).

En 35 ‰ de salinidad, la actividad proteolítica en hepatopáncreas no fue estadísticamente diferente antes y luego de 2 y 4 h de la ingesta de alimento (Fig. 4.6 A).

En 10 ‰ de salinidad, la actividad proteolítica en hepatopáncreas fue menor a las 2 h luego de la ingesta de alimento (t=2h: $2,5 \pm 0,4$; t=4h: $1,9 \pm 0,1 \text{ U} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) con respecto a los valores antes de la ingesta ($4,8 \pm 0,6 \text{ U} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) (Fig. 4.6 B). No se encontraron diferencias significativas entre la actividad proteolítica en hepatopáncreas antes de la ingesta en individuos expuestos a 35 y 10 ‰ de salinidad (Fig. 4.6).

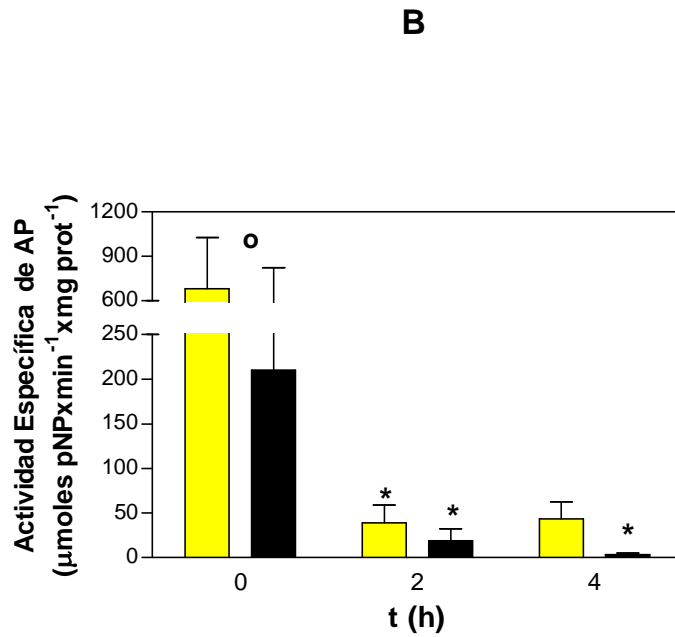
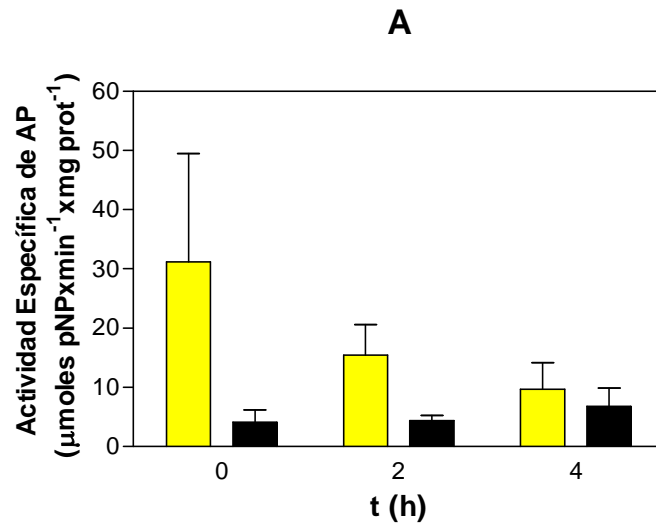


Figura 4.5. Actividades de AP en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos a 35 (A) y 10 % de salinidad (B) antes (t=0, pre-ingesta) y luego de 2 y 4 h de la ingesta de alimento (post-ingesta). * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a t=0. ° Indica diferencia significativa con respecto a la correspondiente actividad a 35 % de salinidad. (■): actividad de AP insensible a levamisol, (■): actividad de AP sensible a levamisol. Los valores son la media ± E.S. para 5 individuos.

Paralelamente a la determinación de las actividades enzimáticas en hepatopáncreas, se determinaron la concentración de proteínas en este órgano y la concentración de glucosa en hemolinfa antes y a tiempos cortos (2-4 h) luego de la ingesta en condiciones de osmoionorregulación e hiperregulación (Figs. 4.6 y 4.7).

La concentración de proteínas en hepatopáncreas de individuos mantenidos a 35 ‰ de salinidad no fue diferente antes y luego de la ingesta de alimento (2 y 4 h) (Fig. 4.6 A, Inset). En individuos mantenidos a 10 ‰ de salinidad la concentración de proteínas fue mayor (alrededor de 58 %) a las 4 h luego de la ingesta (Fig. 4.6 B, Inset).

La concentración de glucosa en hemolinfa fue mayor a las 2 h luego de la ingesta de alimento (35 ‰: $t=0$: $59,7 \pm 5,8$, $t=2$ h: $255,4 \pm 3,7$; 10 ‰: $52 \pm 6,1$, $t=2$ h: $265,9 \pm 31,4$ μg de glucosa \times ml de hemolinfa⁻¹) y se mantuvo constante a las 4 h luego de la ingesta (Fig. 4.7). Esto sugiere que los individuos se encuentran en proceso digestivo a las 2 h luego de la ingesta.

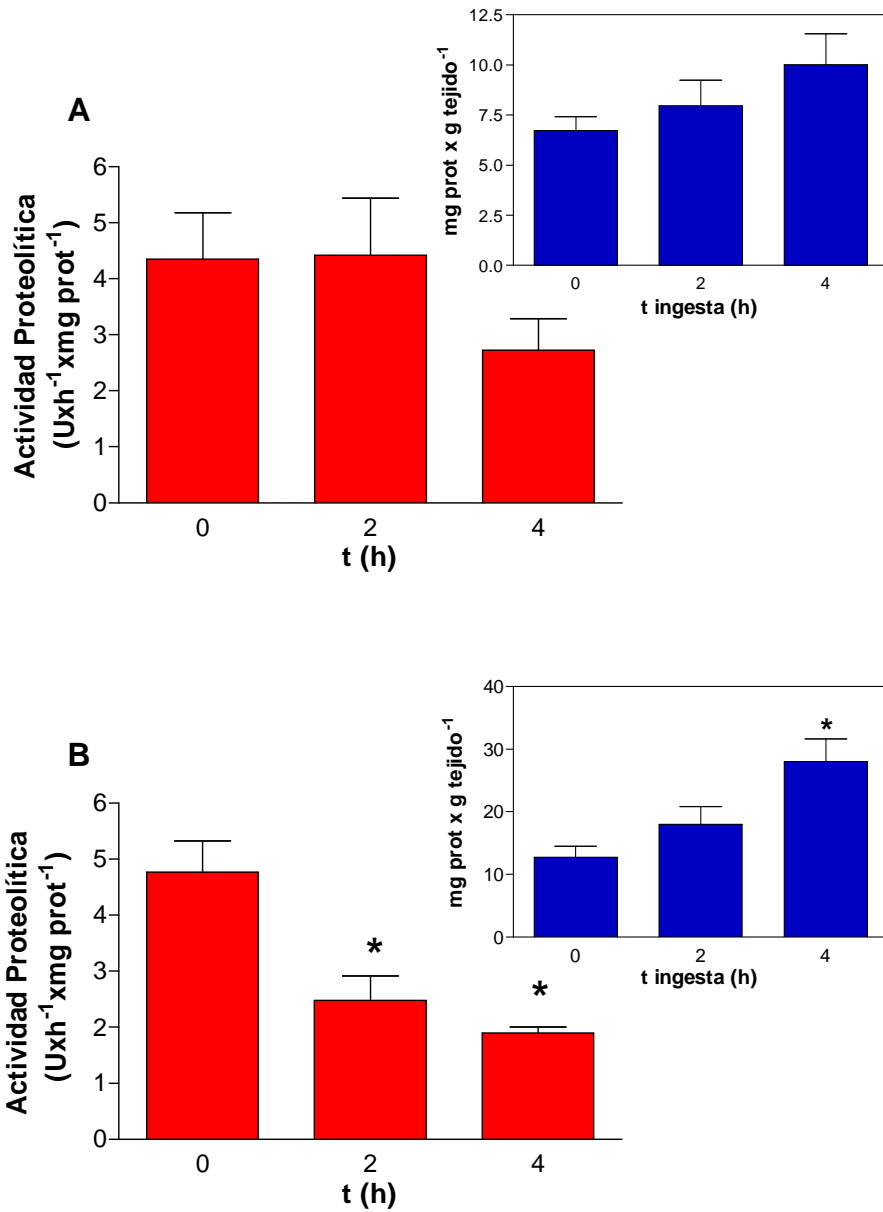


Figura 4.6. Actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos a 35 (A) y 10 (B) ‰ de salinidad antes (t=0, pre-ingesta) y luego de 2 y 4 h de la ingesta de alimento (post-ingesta). Insets: Concentración de proteínas en hepatopáncreas. * indica diferencias significativas con respecto al correspondiente t=0. Los valores son la media ± E.S. para 5 a 10 individuos.

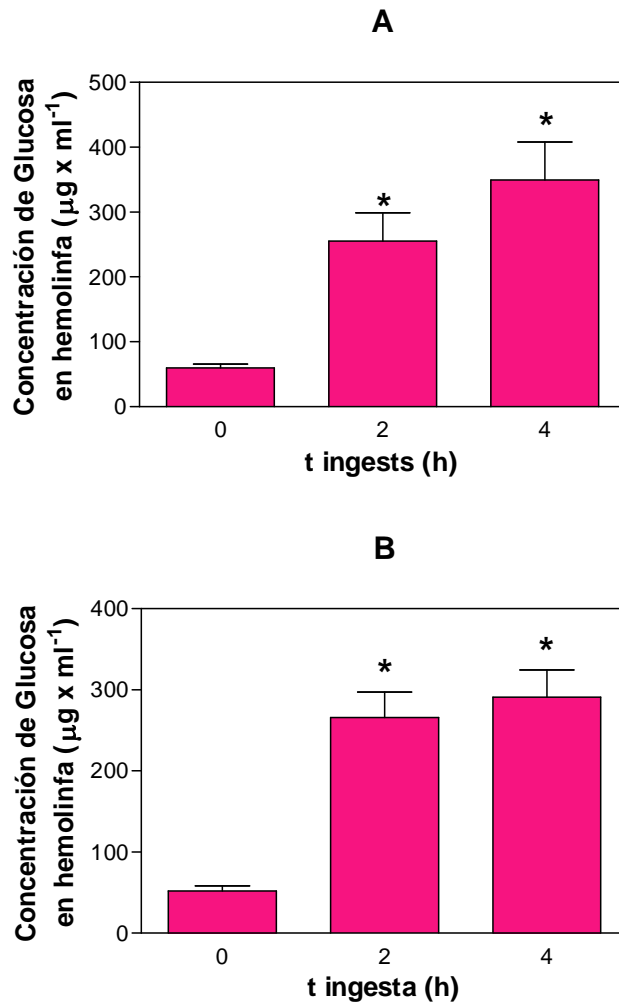


Figura 4.7. Concentración de glucosa en hemolinfa de *N. granulata* mantenidos a 35 (A) y 10 (B) ‰ de salinidad antes (t=0, pre-ingesta) y luego de 2 y 4 h de la ingesta de alimento (post-ingesta). * indica diferencias significativas con respecto a t=0. Los valores son la media ± E.S. para 5 a 10 individuos.

En otra serie de experimentos, se determinaron las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* expuestos a 10 ‰ de salinidad, a tiempos largos luego de la ingesta de alimento. Paralelamente, se determinó la concentración de proteínas en

hepatopáncreas, músculo, branquias anteriores y posteriores; la concentración de glucosa en hemolinfa, y concentración de glucógeno en branquias posteriores (sitio principal de transporte activo de iones durante la hiperregulación) (presente Tesis), y en mediciones realizadas en paralelo en nuestro laboratorio, de concentración de glucógeno en hepatopáncreas, músculo y branquias anteriores (Artillo et al., 2008).

Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en hepatopáncreas fueron similares antes de la ingesta y a tiempos largos (12, 23 y 46 h) luego de la ingesta de alimento (datos no mostrados).

La actividad proteolítica en hepatopáncreas fue similar antes y a tiempos largos luego de 12, 23, 46, 70 y 92 h (datos no mostrados).

A las 12 h luego de la ingesta, la concentración de proteínas en hepatopáncreas fue mayor que antes de la ingesta ($t=0$: $14,8 \pm 2,2$ y $t=12$ h: $25,7 \pm 2,2$ mg prot x g tejido⁻¹) y se mantuvo constante a las 23, 46, 70 y 92 h (Fig. 4.8). En músculo de la quela, la concentración de proteínas fue mayor a las 70 h luego de la ingesta de alimento. En branquias anteriores y posteriores la concentración de proteínas se mantuvo constante a todos los tiempos estudiados (Fig. 4.8, Inset).

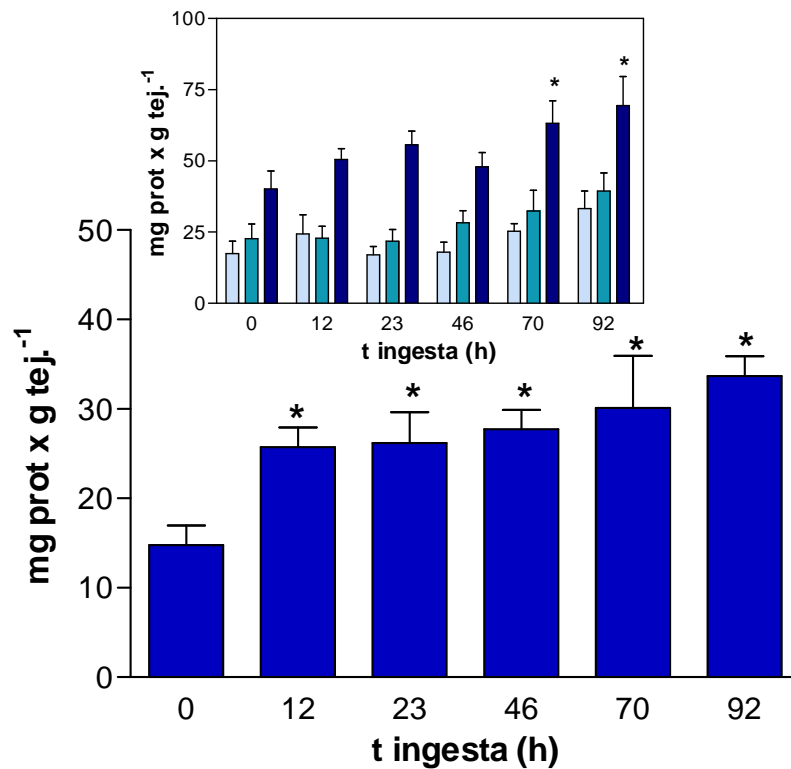


Figura 4.8. Concentración de proteínas en hepatopáncreas de *N. granulata* mantenidos a 10 ‰ de salinidad antes (t=0, pre-ingesta) y luego de 12, 23, 46, 70 y 92 h de la ingesta de alimento. Inset: Concentración de proteínas en branquias posteriores (■), branquias anteriores (■) y músculo de la quela (■). * Indica diferencias significativas con respecto a t=0. Los valores son la media ± E.S. para 4 a 5 individuos.

La concentración de glucosa en hemolinfa fue significativamente menor a las 23 h luego de la ingesta de alimento (t=0: $97,6 \pm 18,3$, t=23 h: $32,4 \pm 3,9$ μg de glucosa x ml de hemolinfa⁻¹) (Fig. 4.9). La concentración de glucógeno en branquias posteriores fue mayor a las 12 h luego de la ingesta (t=0: $15,2 \pm 4,4$, t=12 h: $49,4 \pm 3,3$ mg de glucosa x g de tejido⁻¹) manteniéndose constante hasta las 92 h (Fig. 4.9, Inset). A las 23 y 92 h luego de la ingesta se incrementó la concentración de glucógeno en branquias anteriores ($34,7 \pm 3,6$ y $37,0 \pm 3,8$ mg de glucosa x g de tejido⁻¹ respectivamente). La concentración de glucógeno en hepatopáncreas

y músculo de la quela no varió a tiempos largos luego de la ingesta de alimento (Artillo et al., 2008).

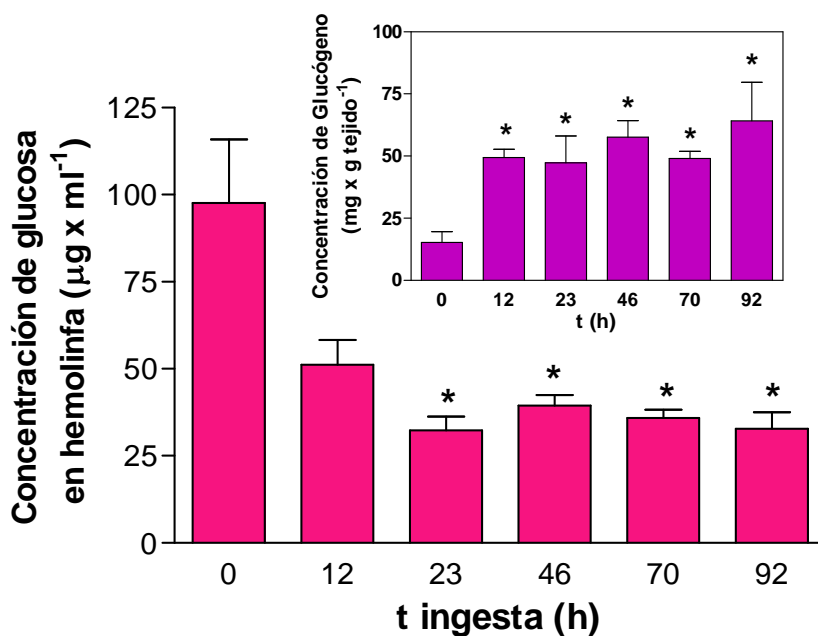


Figura 4.9. Concentración de glucosa en hemolinfa de *N. granulata* mantenidos a 10 % de salinidad antes (t=0, pre-ingesta) y luego de 12, 23, 46, 70 y 92 h de la ingesta de alimento. Inset: concentración de glucógeno en branquias posteriores. *Indica diferencias significativas con respecto a t=0. Los valores son la media ± E.S. para 4 a 6 individuos.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran la existencia de dos actividades de AP: una insensible a levamisol y una sensible a levamisol (Fig. 4.1) y de actividad proteolítica en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*, y el efecto de la salinidad reducida sobre estas actividades a tiempos cortos luego de la ingesta de alimento.

Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en hepatopáncreas de *N. granulata* mostraron una diferente respuesta al pH del medio de reacción (Fig. 4.2) y, además,

difierieron del perfil encontrado para estas actividades en músculo de la quela de individuos de la misma especie (Capítulo 2, presente Tesis). Esto sugiere la posible presencia de distintas isoformas de AP en ambos tejidos. La mayor actividad específica de las AP en hepatopáncreas con respecto a músculo podría estar relacionada con la multiplicidad de roles del hepatopáncreas (por ej. secreción de enzimas digestivas, digestión y absorción de nutrientes, procesos de detoxificación, movilización y reserva de sustratos de energía) y la participación de AP en estos procesos. En hepatopáncreas de la larva del gusano de seda *Bombix mori* se detectó la presencia de dos isoenzimas de AP (una unida a membrana y otra soluble) las cuales mostraron diferencias en sus propiedades antigénicas y bioquímicas (revisión en Eguchi, 1995; Itoh et al., 1999). En varias especies de crustáceos, ha sido observada la presencia de AP en hepatopáncreas pero no se han identificado las formas presentes (van Wormhoudt, 1973; Momin y Rangneker, 1974; Barker y Gibson, 1977; Lovett y Felder, 1990 a, b).

Se conocen distintas enzimas con diferentes actividades proteolíticas en hepatopáncreas de crustáceos (García Carreño, 1994; Lemos et al., 1999; Díaz Tenorio et al., 2006; Navarrete del Toro et al., 2006; Hehemann, et al., 2007; Muhlia Almanzán et al., 2008). Queda por ser investigado qué proteasas están presentes en hepatopáncreas de *N. granulata* contribuyendo a la actividad proteolítica medida en la presente Tesis.

En vertebrados, se ha encontrado que varias enzimas digestivas se producen en forma de zimógenos inactivos (Schick et al., 1984; Wieloch, 1985; Grady et al., 1998; Hara et al., 2000). Este es el caso para enzimas proteolíticas en varias especies de crustáceos estudiadas (Klein et al., 1996; Hernández Cortes et al., 1999; Saíenz et al., 2004; revisión en Sánchez Paz et al., 2006). En algunos crustáceos, también se ha demostrado que las enzimas digestivas se encuentran en forma activa en el hepatopáncreas (Barker y Gibson, 1977; Lovett y Felder, 1990 a; Díaz Tenorio et al., 2006; Allardyce y Linton, 2008). Las enzimas digestivas son sintetizadas en el hepatopáncreas y secretadas durante el proceso de digestión del alimento

(Barker y Gibson, 1977; Lovett y Felder, 1990 a; Díaz Tenorio et al., 2006; Linton et al., 2006; Hehemann, et al., 2007). La alta actividades de AP y proteolítica encontradas en hepatopáncreas de individuos privados de alimento (Figs. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6) sugiere que este es el caso para *N. granulata*.

Durante el proceso digestivo el hepatopáncreas de crustáceos secreta grandes cantidades de enzimas digestivas tales como proteasas (Ceccaldi, 1989; 1997). Las enzimas proteolíticas altamente activas son liberadas hacia el estómago cardíaco donde facilitan el primer paso en la hidrólisis de los péptidos provenientes de la dieta (Barker y Gibson, 1977; Díaz Tenorio et al., 2006; Navarrete del Toro et al., 2006). En *Homarus gammarus*, se ha demostrado que la AP es una de las enzimas liberadas a partir del hepatopáncreas durante el proceso de digestión (Barker y Gibson, 1977).

La disminución de las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* a tiempos cortos (2 y 4 h) luego de la ingesta en individuos expuestos a condiciones de baja salinidad, y el mantenimiento de valores similares de estas actividades a los mismos tiempos en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad (Figs. 4.5 B y 4.6 B) sugiere la secreción diferencial de estas enzimas y la regulación temporal de la misma en relación a la hiperregulación. La regulación de la secreción de AP y proteasas a partir de hepatopáncreas de *N. granulata* a tiempos cortos luego de la ingesta de alimento en condiciones de baja salinidad podría constituir un mecanismo de ajuste digestivo a nivel bioquímico en respuesta a las demandas incrementadas de energía durante la hiperregulación. En experimentos realizados en paralelo en nuestro laboratorio, se observó una respuesta similar de actividades de sacarasa y maltasa en hepatopáncreas de *N. granulata* en condiciones de hiperregulación (Asaro, 2009). En el camarón *Litopenaeus vannamei* se sugirió que la mayor síntesis y liberación de enzimas digestivas podría contribuir con una provisión aumentada de energía necesaria para la osmorregulación (Li et al., 2008). En el camarón *Orconectes limosus* se ha

demostrado que varias hormonas gatrointestinales de vertebrados inducen la liberación de enzimas digestivas (ej. proteasas) a partir de secciones de hepatopáncreas, sugiriendo la presencia de factores hormonales análogos en crustáceos para estimular la secreción de enzimas digestivas en respuesta a la ingesta de alimento (Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999). Si mecanismos de regulación similares operan en *N. granulata* en condiciones de hiperregulación requiere más investigación.

Por otro lado, la mayor actividad de AP en condiciones de baja salinidad con respecto a 35 ‰ de salinidad antes de la ingesta en individuos privados de alimento durante 5 días sugeriría el rol de esta actividad en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación en condiciones de privación prolongada de alimento tales como la movilización de biomoléculas de reserva de energía. En este contexto, se ha demostrado que la AP en vertebrados está implicada en la movilización de lípidos e hidratos de carbono (revisión en Warnes, 1972; Mahmood et al., 2003; Kaur et al., 2007; Yáñez Ruiz y Molina Alcalde, 2007). El hecho que las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata* fueron similares antes y a tiempos largos (12 h o más) luego de la ingesta de alimento en condiciones de hiperregulación, sugiere la existencia de una síntesis *de novo* y/o de una reabsorción de las mismas hacia el hepatopáncreas en condiciones de privación de alimento. Además, el mantenimiento de una alta actividad de estas enzimas en hepatopáncreas en condiciones de privación prolongada de alimento, soporta la idea que la baja salinidad influye sobre la secreción de enzimas digestivas disparada por la ingesta de alimento. Sin embargo, se requiere mayor investigación para dilucidar los mecanismos de regulación de la actividad de estas enzimas en hepatopáncreas de *N. granulata*.

El incremento en la concentración de proteínas luego de 4 h de la ingesta de alimento (Fig. 4.8), en condiciones de salinidad reducida, sugiere que el hepatopáncreas constituiría un sitio de reserva de proteínas luego de la ingesta de alimento en condiciones de

hiperregulación, posiblemente mediante la síntesis *de novo* a partir de precursores provenientes de la dieta. Además, la alta concentración de proteínas a tiempos largos y cortos luego de la ingesta de alimento soporta aún más la idea de su síntesis *de novo* a corto plazo en hepatopáncreas a partir de precursores de la dieta en baja salinidad. En el cangrejo *Carcinus maenas*, se encontró un aumento de la tasa de síntesis de proteínas en hepatopáncreas antes de las 5 h posteriores a la ingesta de alimento, sugiriéndose que este órgano tiene un importante rol en el metabolismo de proteínas del organismo debido a su alta tasa de recambio proteico en comparación con otros tejidos, tales como músculo (Houlihan et al., 1990; Mente et al., 2003).

Por otro lado, si el aumento en la concentración de proteínas del músculo de la quela a tiempos largos (70 h) luego de la ingesta de alimento se relaciona con una síntesis *de novo* a partir de precursores provenientes de la dieta requiere mayor investigación. En este contexto, en experimentos *in vitro* con músculo de la mandíbula de *N. granulata* se encontró que ocurre una toma activa de aminoácidos la cual es afectada por un estrés hiperosmótico (Schein et al., 2005a). El hecho que la concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores fue similar antes y a tiempos largos después de la ingesta en condiciones de baja salinidad sugiere que las mismas no constituirían un sitio de reserva de proteínas en condiciones de hiperregulación (Fig. 4.8, Inset). Sin embargo, no puede descartarse que las branquias constituyan un sitio de destino de aminoácidos como precursores para ser utilizados en la síntesis de glucógeno. En experimentos *in vitro* se demostró que el músculo de la mandíbula y el hepatopáncreas de *N. granulata* exhiben capacidad gluconeogénica utilizando alanina como precursor (Oliveira et al., 2004; Schein et al., 2005b). Sin embargo, faltan estudios que determinen si en branquias de *N. granulata* también se produce gluconeogénesis y posterior glucogenogénesis a partir de aminoácidos. Por otro lado, el incremento en la concentración de glucógeno en las branquias posteriores (principal sitio de transporte activo de iones durante la hiperregulación) de *N. granulata* (Fig. 4.9, Inset) junto con la disminución en la concentración

de glucosa en hemolinfa a tiempos largos luego de la ingesta (Fig. 4.9), sugieren la utilización de glucosa proveniente de la dieta para la síntesis de glucógeno en branquias. En este contexto, se demostró *in vitro* la síntesis *de novo* de glucógeno a partir de la toma de glucosa del medio en branquias posteriores de *N. granulata* (Kucharski et al., 2002). Además, el hecho que el incremento en la concentración de glucógeno en branquias posteriores precedió al incremento observado en la concentración de glucógeno en branquias anteriores y a que el contenido de glucógeno en músculo de la quela y en hepatopáncreas no varió a tiempos largos luego de la ingesta de alimento (Artillo et al., 2008) sugiere la existencia de una compleja reorganización metabólica en *N. granulata* que podría relacionarse con las demandas diferenciales de energía en condiciones de hiperregulación. Por otro lado, se ha demostrado que *N. granulata* expuesto a dietas de distinta calidad y privado de alimento por distintos períodos de tiempo no sufre variaciones en el contenido y/o distribución de biomoléculas de reserva a tiempos cortos de privación de alimento (menores a una semana) (Vinagre y da Silva, 2002; Oliveira et al., 2004) lo cual refuerza la idea del efecto de la baja salinidad sobre las variaciones en las actividades enzimáticas y concentración de proteínas y glucógeno encontrados en la presente Tesis.

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran que el hepatopáncreas de *N. granulata* exhibe altas actividades de AP y proteolítica las cuales son afectadas a tiempos cortos luego de la ingesta de alimento en condiciones de hiperregulación. Las menores actividades de AP y proteolítica sugieren su secreción diferencial en baja salinidad lo que podría resultar en una modificación de la capacidad digestiva de *N. granulata* constituyendo así un mecanismo de ajuste secundario a la hiperregulación. Sin embargo, se necesitan mayores estudios para establecer si existe una relación entre la disminución de la actividad proteolítica y actividades de AP en hepatopáncreas a corto plazo luego de la ingesta en *N. granulata* en baja salinidad y el incremento a largo plazo observado en la concentración de

glucógeno en branquias y su posterior utilización como fuente de energía para la hiperregulación. Futuros estudios deberán focalizarse en establecer el rol fisiológico exacto de estas actividades en hepatopáncreas como parte de los complejos mecanismos de flexibilidad fisiológica y bioquímica de *N. granulata* en relación a la salinidad ambiental.

CAPÍTULO 5:

RESPUESTAS A EMERSIÓN EN

MÚSCULO DE LA QUELA Y HEPATOPÁNCREAS

DE *Neohelice granulata*

INTRODUCCIÓN

Los cangrejos anfibios con respiración bimodal presentan una serie de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y comportamentales que les permiten realizar un intercambio respiratorio eficiente tanto en agua como en aire (Henry, 1994). Así, varias especies de este grupo de cangrejos se mueven activamente entre el agua y la tierra mostrando una alta tasa metabólica, tanto sumergidos como durante la emersión (Cameron, 1971; Al-Wassia et al., 1989; Airries y McMahon, 1996).

Neohelice granulata es un cangrejo semiterrestre de respiración bimodal. Por su estilo de vida, este cangrejo permanece fuera del agua por largos períodos de tiempo (Schmitt y Santos, 1993; Maciel et al., 2008), siendo activo tanto cuando está sumergido como cuando está expuesto al aire (emersión) (Boschi, 1964; Santos et al., 1987). Se han realizado distintos estudios sobre fisiología respiratoria y sobre regulación iónica y equilibrio ácido-base durante la emersión de *N. granulata* de distintas áreas geográficas de Brasil y Argentina (Santos et al., 1987; Luquet y Ansaldo, 1997; Luquet et al., 1998; Halperin et al., 2000). Así, se ha observado que a lo largo de un período de emersión de 4 h, *N. granulata* no sufre hipoxia venosa, por lo que esta especie es capaz de mantener una tasa eficiente de difusión de oxígeno a través de las superficies respiratorias (Luquet et al., 1998; Halperin et al., 2000). *N. granulata* compensa la acidosis respiratoria debida a la presión aumentada de dióxido de carbono en hemolinfa controlando la diferencia de iones fuertes (diferencia entre la concentración de Na^+ y la concentración de Cl^-) en la hemolinfa, por medio de la toma de Na^+ a través de las branquias (Luquet et al., 1998). Se ha propuesto que esta regulación de la diferencia de iones fuerte en hemolinfa se llevaría a cabo mediante la toma de Na^+ desde el medio externo a través de las branquias. El hecho que esta respuesta compensatoria es inhibida

por la adición en el medio externo de acetazolamida (inhibidor de la anhidrasa carbónica) sugiere que esta enzima podría estar involucrada en estos procesos (Luquet et al., 1998). Sin embargo, faltan estudios, aún, sobre respuestas de otros componentes a nivel bioquímico (ej. actividades enzimáticas), en diferentes órganos o tejidos (ej. músculo, hepatopáncreas), posiblemente involucrados en mecanismos de ajustes secundarios a la emersión en *N. granulata*.

En la planicie de marea de la laguna costera de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires), *N. granulata* exhibe períodos de emersión variables, desplazándose por debajo de la línea de marea baja y por encima de la de marea alta. Dadas estas condiciones, los individuos de esta especie pueden ser observados sumergidos o expuestos al aire independientemente de la altura de la marea (Spivak, 1997). En la presente Tesis, se ha demostrado la respuesta diferencial a salinidad ambiental de actividades Na^+/K^+ ATPasa, Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína y de fosfatasas alcalinas (AP) en músculo de la quela de *N. granulata* sugiriendo el rol del músculo y de estas actividades enzimáticas en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación en este cangrejo (Capítulo 3). También, se demostró la respuesta de las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas en relación a la salinidad ambiental, sugiriendo que la modulación de la secreción de enzimas del tracto digestivo es uno de los mecanismos de ajuste subyacentes a la hiperregulación en *N. granulata* (Capítulo 4). En este contexto, se estudió si estas actividades enzimáticas son afectadas por la emersión, de manera de determinar si constituyen componentes en posibles mecanismos de ajuste a nivel bioquímico en músculo y hepatopáncreas en repuesta a la emersión y, además, establecer aspectos comparativos de la respuesta de esas actividades a distintas condiciones ambientales. Para llevar a cabo esto se estudió:

- el efecto de la emersión sobre las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína y Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela de *N. granulata*;
- el efecto de la emersión sobre las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata*;
- el efecto de la emersión sobre las actividades de AP sensible e insensible a levamisol en hepatopáncreas de *N. granulata*;
- el efecto de la emersión sobre la actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Na_2ATP (adenosin 5'-trifosfato, libre de vanadato), Tris-(hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina), ouabaína (Gstrofantina), levamisol (L []-2, 3, 5, 6-Tetrahidro-6-fenilimidazol [2,1-b] thiazol) y furosemida fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); pNP (p-nitrofenol), azida sódica, sacarosa, ácido clorhídrico, cloruro de magnesio y cloruro de sodio fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); pNPP (p-nitrofenilfosfato), cloruro de potasio y Coomassie Blue (G250) fueron de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Se realizó según se describe en el Capítulo 1.

Para estudiar el efecto de la emersión, individuos mantenidos en las condiciones previamente descritas fueron sumergidos totalmente durante 24 h (pre-emersión). Luego, se transfirieron a recipientes individuales sin agua y se mantuvieron durante los tiempos indicados expuestos al aire. El máximo tiempo de emersión utilizado (240 min) se basa en lo previamente descrito por Luquet et al. (1998) sobre la tolerancia de *N. granulata* a la emersión. Para evitar la desecación se colocó un papel húmedo en el fondo de los recipientes.

Preparación de Extractos enzimáticos

Los extractos de músculo se prepararon como se describió en el Capítulo 1 de la presente Tesis. Los extractos de hepatopáncreas se prepararon como se describió en el Capítulo 4 de la presente Tesis.

Determinación de las actividad Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela

La actividad Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela se determinó como se describió en el Capítulo 3 de la presente Tesis.

Determinación de las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela

Las actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela se determinaron como se describió en el Capítulo 1 de la presente tesis.

Determinación de las actividades de AP en músculo de la quela

Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela se determinaron como se describió en el Capítulo 2 de la presente tesis.

Determinación de las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas

Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol, y la actividad proteolítica en hepatopáncreas se determinaron como se describió en el Capítulo 4 de la presente tesis.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Determinación de las concentraciones iónicas en hemolinfa

Se realizó según se describe en el Capítulo 3.

Análisis de resultados experimentales

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Para el estudio de las concentraciones de iones en hemolinfa, y las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas se realizó un análisis paramétrico (ANOVA de una vía) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Un test *a posteriori* (método Holm-Sidak) fue utilizado para identificar diferencias y un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Para el estudio de la emersión sobre las actividades ATPásicas y de AP en músculo un análisis paramétrico (t-test para muestras apareadas) o no paramétrico (Wilcoxon) fue utilizado y un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Efecto de la emersión sobre las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína en músculo de la quela de *N. granulata*

La emersión, no afectó significativamente la actividad Na^+/K^+ ATPasa en músculo de la quela de *N. granulata* (Fig. 5.1).

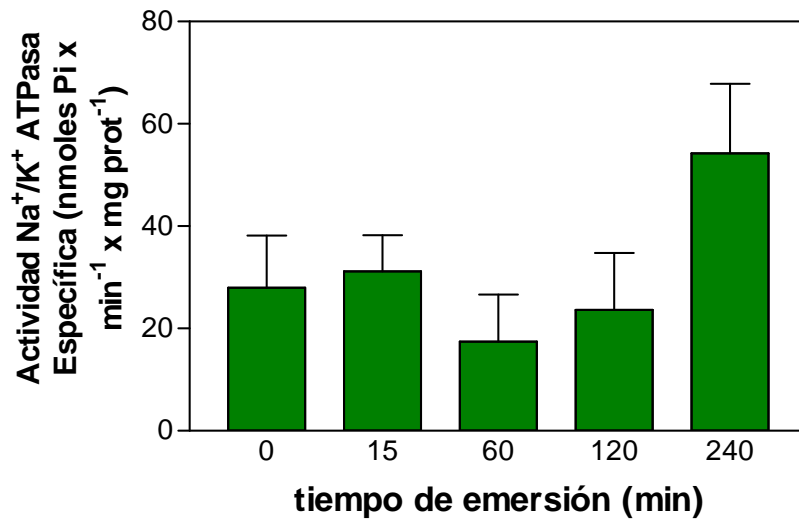


Figura 5.1. Actividad Na⁺/K⁺ ATPasa a distintos tiempos luego de la emersión en músculo de la quela de *N. granulata*. Individuos sumergidos totalmente durante 24 h (pre-emersión) y posteriormente expuestos al aire (emersión) durante 15, 60, 120 y 240 min. t₀: pre-emersión. Los datos son la media ± E.S. para 5 individuos.

La actividad Na⁺ ATPasa insensible a furosemida en músculo de la quela de *N. granulata* fue mayor luego de 240 min de emersión (pre-emersión 20 ± 6 y emersión 33 ± 6 nmoles Pi x min⁻¹ x mg prot⁻¹). La emersión durante 240 min no afectó la actividad Na⁺ ATPasa sensible a furosemida (Fig. 5.2).

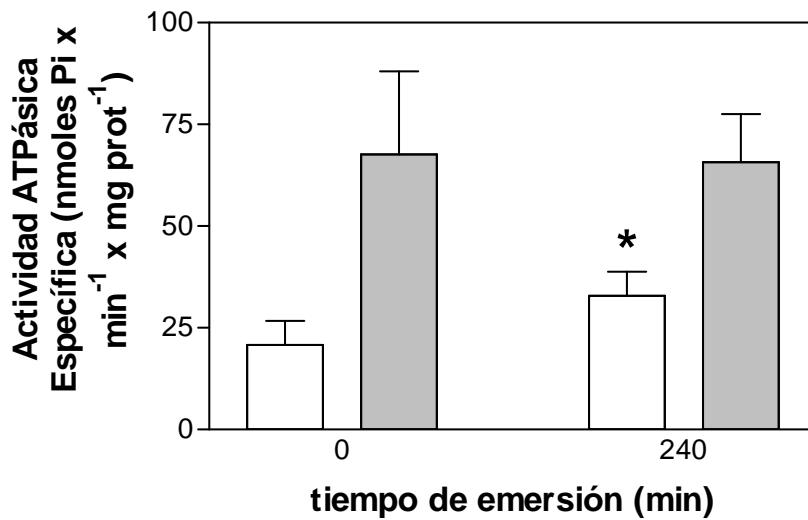


Figura 5.2. Actividades Na^+ ATPasa insensible a furosemida (□) y Na^+ ATPasa sensible a furosemida (■) en músculo de *N. granulata* antes y luego de la emersión. Individuos sumergidos totalmente durante 24 h (pre-emersión) y posteriormente y expuestos al aire (emersión) durante 240 min. * indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente a t_0 (pre-emersión). Los datos son la media \pm E.S. para 5 individuos.

Actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* expuestos a emersión

Las actividades de AP en músculo de la quela no fueron afectadas por la emersión (Fig. 5.3).

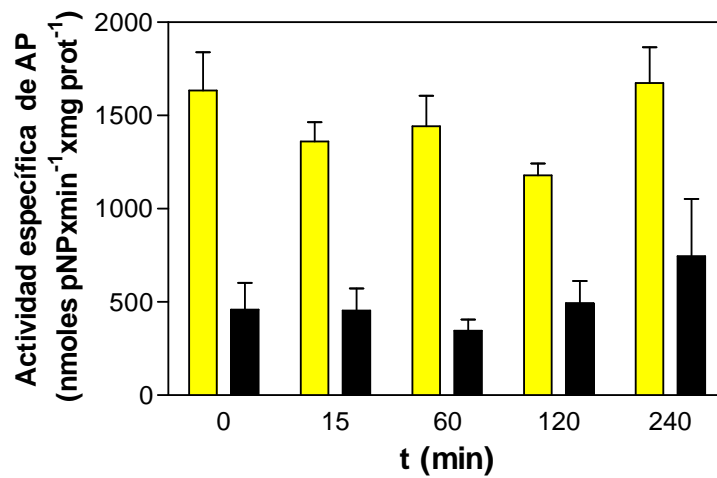


Figura 5.3. Actividades de AP insensible a levamisol (■) y sensible a levamisol (■) en músculo de la quela de *N. granulata* en emersión. Individuos sumergidos totalmente durante 24 h (pre-emersión, t0) y posteriormente expuestos al aire (emersión) durante 15, 60, 120 y 240 min. Los valores son las medias ± E.S. para 5 individuos

Efecto de la emersión sobre concentraciones iónicas en hemolinfa

Similarmente a lo descrito por Luquet et al. (1998), la diferencia en las concentraciones de iones fuertes ($[Na^+] - [Cl^-]$) en hemolinfa fue mayor a los 60 y 120 min de la emersión con respecto a t0, 15 y 240 min de emersión (Fig. 5.4).

*Actividades de AP en hepatopáncreas de *N. granulata* en condiciones de emersión*

Las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol en hepatopáncreas de individuos de *N. granulata* no fueron afectadas por la exposición durante 2 y 4 h a emersión (Fig 5.5).

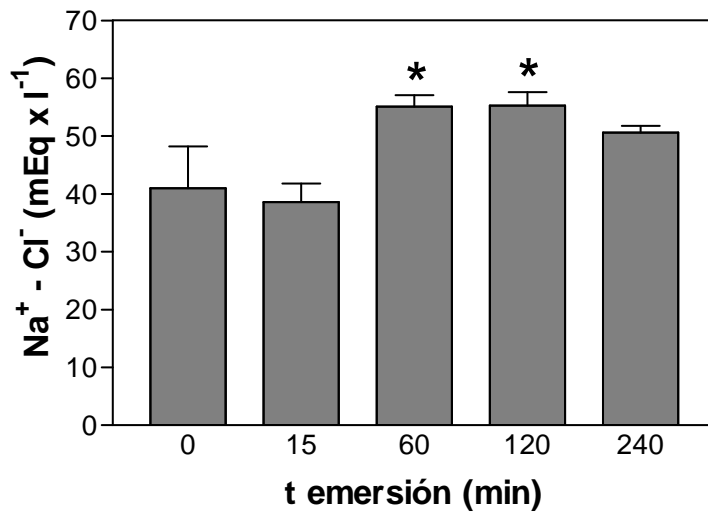


Figura 5.4. Diferencia de iones fuertes ($[Na^+] - [Cl^-]$) en hemolinfa de *N. granulata* antes (pre-emersión: t_0) y luego de diferentes tiempos de emersión. Los valores son la media \pm E.S. para 4 individuos. * indica diferencias significativas con respecto al correspondiente t_0 (pre-emersión).

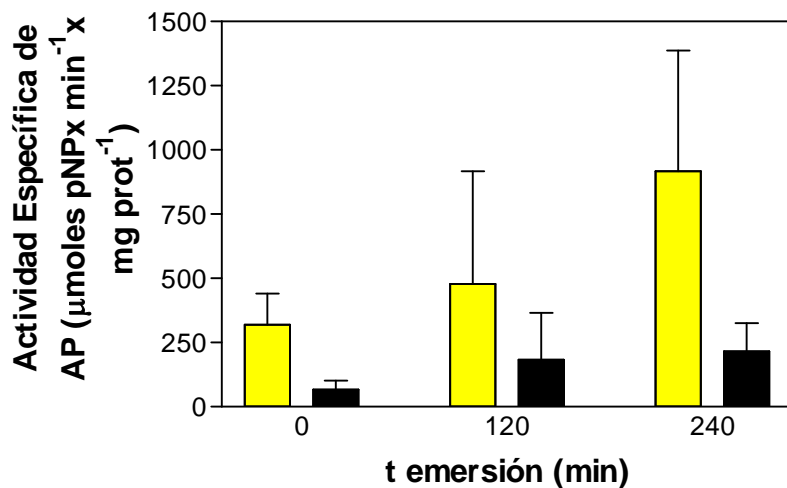


Figura 5.5. Actividades de AP insensible a levamisol (■) y sensible a levamisol (■) en hepatopáncreas de *N. granulata* en emersión. Individuos fueron totalmente sumergidos durante 24 h (t_0 ; pre-emersión). Posteriormente, se expusieron al aire durante 120 y 240 min (emersión). Los valores son las medias \pm E.S. de 5 individuos.

Efecto de la emersión sobre la actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*

La actividad proteolítica en hepatopáncreas de individuos expuestos a emersión durante 120 min fue similar a la actividad previa a la emersión. La actividad proteolítica en hepatopáncreas fue mayor luego de 240 min de emersión ($11,9 \text{ U} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg} \text{ prot}^{-1}$) con respecto a la actividad pre-emersión ($5,8 \text{ U} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg} \text{ prot}^{-1}$) (Fig. 5.6).

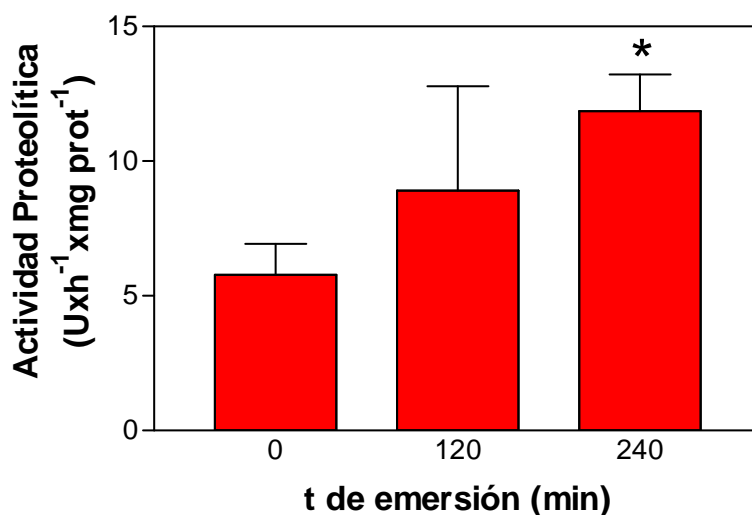


Figura 5.6. Efecto de la emersión sobre la actividad proteolítica en hepatopáncreas de *N. granulata*. * indica diferencias significativas con respecto a t_0 (pre-emersión). Los valores son la media \pm E.S. para 5 individuos.

La concentración de proteínas en hepatopáncreas no varió luego de 120 y 240 min de emersión (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran el efecto de la emersión sobre la actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida de músculo de la quela y sobre la actividad proteolítica en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. Estos resultados sugieren el rol del músculo, del hepatopáncreas, y de estas actividades enzimáticas, en mecanismos de ajuste a nivel bioquímico secundarios a la emersión en este cangrejo.

Se ha demostrado que *N. granulata* exhibe características a nivel morfológico y fisiológico que le permiten emerger por varias horas sin sufrir hipoxia y reestableciendo el pH de la hemolinfa (Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998; Halperin et al., 2000). Se ha observado que *N. granulata* exhibe un incremento inicial en la Pco_2 en hemolinfa, asociada a una acidosis respiratoria, la cual es compensada a los 60 min de emersión (Luquet y Ansaldo, 1996). Se ha sugerido que la acidosis respiratoria producida en los primeros momentos de la emersión es contrarrestada mediante la toma activa de Na^+ a través de las branquias, produciéndose un incremento de la diferencia de los iones fuertes ($[\text{Na}^+] - [\text{Cl}^-]$) en la hemolinfa entre los 60 y 120 min de emersión (Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998). Similarmente a lo descrito por Luquet et al. (1998), en esta tesis se observó un incremento de la diferencia de los iones fuertes en la hemolinfa de individuos de *N. granulata* de la laguna de Mar Chiquita luego de 60 y 120 min de emersión (Fig. 5.4). Si este incremento se debe a la activación de un mecanismo de regulación del pH de la hemolinfa durante las dos primeras horas de emersión, como se sugirió para *N. granulata* de otras áreas (Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998) requiere mayor investigación. Además, la menor diferencia de iones fuertes en la hemolinfa de *N. granulata* expuesto a emersión por 240 min (Fig. 5.4) fue similar a lo previamente reportado (Luquet y Ansaldo, 1996; Luquet et al., 1998). Por otro lado, se observó también un incremento en la actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida en

músculo de la quela de *N. granulata* luego de 240 min de emersión (Fig. 5.2), sugiriendo el rol del músculo y de esta actividad enzimática en mecanismos de ajustes secundarios a la emersión en este cangrejo. El hecho que el incremento de esta actividad y la menor diferencia de iones fuertes en hemolinfa (Fig. 5.4) se observen al mismo tiempo (240 min) podría sugerir que la actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida estaría involucrada en mecanismos de ajuste en músculo que se producen cuando ya no es posible mantener la diferencia iónica debido probablemente a la disminución en la reserva de agua en las cámaras branquiales y se produce una nueva acidosis de la hemolinfa (Luquet et al., 1998). La actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida en músculo podría estar involucrada en el mantenimiento del gradiente electroquímico necesario para el funcionamiento de distintos sistemas de transporte dependientes de Na^+ involucrados en mecanismos de ajuste secundarios a la emersión (por ej., regulación del equilibrio ácido-base, movilización de sustratos de energía). En músculo del cangrejo intermareal *Carcinus maenas* se observaron incrementos en los niveles de amonio y de aminoácidos libres luego de la emersión prolongada, sugiriéndose un rol de este tejido en la regulación del metabolismo de nitrógeno, bajo esas condiciones, al actuar como sitio de almacenamiento temporario y detoxificación de amonio mediante la síntesis de aminoácidos no esenciales (Durand y Renault, 1998; Durand et al., 1999). Si la actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida está involucrada en mecanismos de ajustes similares en músculo de la quela de *N. granulata* requiere más investigación. Por otro lado, el hecho que las actividades Na^+/K^+ ATPasa y Na^+ ATPasa sensible a furosemida coexistentes en el músculo de la quela de *N. granulata*, las cuales fueron afectadas por salinidad ambiental (Capítulo 3, presente Tesis), no fueron afectadas por la emersión, muestra la modulación diferencial de la actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida durante la emersión y, además, la especificidad de la respuesta de estas actividades enzimáticas en relación a distintas condiciones ambientales. Similarmente, se encontró que la actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la

quela, la cual fue afectada por la salinidad ambiental (Capítulo 3, presente Tesis), no fue afectada por emersión, sugiriendo, también, la respuesta diferencial dependiendo de la condición ambiental de esta actividad. Por otro lado, la actividad de AP sensible a levamisol en músculo de la quela de *N. granulata*, la cual no fue afectada por la salinidad ambiental (Capítulo 3, presente Tesis), tampoco fue afectada por la emersión. Esto sugiere que las actividades de AP en músculo no serían moduladas por la emersión. El hecho que experimentos preliminares que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio muestran resultados similares de la respuesta de estas actividades enzimáticas en músculo a la emersión en individuos previamente mantenidos en baja salinidad (Pinoni, obs. pers.), sugieren la especificidad del efecto de la emersión sobre estas actividades enzimáticas.

Para nuestro conocimiento, no se ha estudiado aún el efecto de la emersión sobre la actividad de enzimas del hepatopáncreas de cangrejos eurihalinos. En la presente Tesis, (Capítulo 4) demostramos que el hepatopáncreas de *N. granulata* exhibe altas actividades de AP insensible y sensible a levamisol, y proteolítica, sugiriendo que la modulación de la secreción de las mismas luego de la ingesta de alimento podría constituir un mecanismo de ajuste secundario a la hiperregulación. Similarmente a lo observado en músculo, las actividades de AP en hepatopáncreas no fueron afectadas por la emersión, sugiriendo que estas actividades tampoco serían moduladas por la emersión. A diferencia de las actividades de AP, la actividad proteolítica se incrementó luego de la emersión por 240 min, sugiriendo una distinta modulación por emersión y salinidad (Capítulo 4, presente Tesis).

Se sabe que el hepatopáncreas de crustáceos es un sitio de reserva de proteínas (revisión en Sánchez Paz et al., 2006). Además, se ha observado que *N. granulata* exhibe una movilización diferencial de sustratos de energía frente a distintos tipos de estrés (Schmitt y Santos, 1993; Luvizotto-Santos, 2003; Oliveira et al., 2004). El incremento en la actividad proteolítica en hepatopáncreas en respuesta a la emersión podría asociarse a un aumento en la

degradación de las proteínas almacenadas en hepatopáncreas, constituyendo, posiblemente, un mecanismo de ajuste en el metabolismo proteico secundario a la emersión permitiendo a este cangrejo soportar períodos de emersión prolongados. Por otro lado, como la mayor actividad proteolítica se observó luego de 240 min de emersión, tiempo en el que se encontró también un incremento en la actividad Na^+ ATPasa en músculo y límite impuesto por los mecanismos compensatorios asociados con la disminución de la diferencia de iones fuertes (Fig. 5.4, Luquet et al., 1998), este aumento podría constituir un paso previo y preparatorio para la posterior degradación de proteínas almacenadas en hepatopáncreas como un mecanismo de ajuste en condiciones de emersión.

En conclusión, los resultados del presente capítulo sugieren un rol diferencial de la actividad Na^+ ATPasa insensible a furosemida y del músculo frente a estrés por emersión prolongada así como también el rol de la actividad proteolítica y del hepatopáncreas. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar el exacto rol de estas actividades enzimáticas de músculo de la quela y hepatopáncreas en mecanismos de ajuste asociados a la emersión (por ej. movilización de reservas, regulación del equilibrio ácido base, metabolismo de nitrógeno).

CAPÍTULO 6:

CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y RESPUESTA A

SALINIDAD DE ACTIVIDADES DE FOSFATASA

ALCALINA EN MÚSCULO DE LA QUELA DE

Cyrtograpsus angulatus

INTRODUCCIÓN

Cyrtograpsus angulatus es un cangrejo eurihalino que habita intermareales rocosos de costas abiertas y también penetra en ambientes estuariales (Spivak, 1988; 1999). *C. angulatus* es móvil y activo en el intermareal, principalmente cuando el área está cubierta por la marea, pero se refugia bajo las rocas o en el inframareal somero durante la bajamar (Spivak, et al., 1994). En el intermareal de la laguna costera de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, Argentina), *C. angulatus* está expuesto a cambios abruptos y frecuentes en la salinidad ambiental, rango entre 4 y 35 ‰ (Anger et al., 1994; Spivak et al., 1994).

Se han realizado muy pocos estudios sobre la fisiología bioquímica de este cangrejo. Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que *C. angulatus* de la laguna de Mar Chiquita exhibe una alta capacidad ionorregulatoria frente a cambios abruptos a salinidad ambiental reducida (López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003). En condiciones de salinidad ambiental reducida, se ha sugerido para este cangrejo, un rol diferencial de las branquias anteriores y posteriores, y de la Na⁺/K⁺ ATPasa branquial en la hiperregulación tanto a corto como a largo plazo (López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003; Elhalem y López Mañanes, 2004). Además, se encontró una respuesta diferencial a serotonina de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa de branquias individuales sugiriendo la existencia de mecanismos diferenciales de regulación mediados por esta amina biogénica en branquias anteriores y posteriores de *C. angulatus* (Elhalem y López Mañanes, 2003). Sin embargo, los mecanismos de ajuste a nivel bioquímico, en otros órganos o tejidos de *C. angulatus*, bajo condiciones de salinidad reducida han sido menos investigados. En este contexto, determinamos previamente la presencia, características y respuesta a baja salinidad de actividad Na⁺/K⁺ ATPasa y de AP total en músculo de la quela de *C. angulatus* de la laguna

costera de Mar Chiquita, sugiriendo el rol de esta enzima y del músculo en mecanismos de ajuste secundarios a la osmoionorregulación (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 a, b).

En mamíferos, las AP han sido ampliamente estudiadas y ha sido demostrada su participación en diferentes procesos fisiológicos (Warnes, 1972; Pekarthy et al., 1972; Cyboron, 1982; Moss, 1992; Hessle et al., 2002; Hoemann et al., 2008; Geddes y Philpot et al., 2008). Las AP en invertebrados han sido mucho menos estudiadas. A pesar de que la AP ha sido identificada y caracterizada en varios tejidos de invertebrados (Itoh et al., 1999; Chen et al., 2000; 2005; Park et al., 2001; Mazorra et al., 2002; Xiao et al., 2002), su exacto rol fisiológico no ha sido aún claramente establecido.

El rol de AP en respuesta a variaciones en la salinidad ambiental ha sido escasamente estudiado en cangrejos eurihalinos. Se ha determinado la existencia de una actividad de AP sensible a baja salinidad en branquias posteriores del cangrejo eurihaliño *Callinectes sapidus*, la cual podría modular la respuesta osmorregulatoria como efector para el incremento de la actividad Na^+/K^+ ATPasa branquial (Lovett et al., 1994). Los resultados de esta Tesis (Capítulo 4) muestran la presencia de dos actividades de AP en músculo de la quela de *Neohelice granulata* de la laguna de Mar Chiquita y el efecto diferencial de la aclimatación a salinidad reducida sobre la actividad de AP insensible a levamisol. Preliminarmente determinamos la existencia de actividad de AP a pH 9 (actividad total) en músculo de la quela de *C. angulatus*, la cual fue sensible a la salinidad ambiental y a dopamina (DA) *in vivo* (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 b). Además, en la presente Tesis se demostró la existencia de dos actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* con un respuesta diferencial a la salinidad ambiental y a mensajeros químicos (Capítulo 3).

Como parte del estudio integrativo de mecanismos de ajuste frente a estrés ambiental, se estudió:

- la existencia y características bioquímicas de las actividades de AP presentes en músculo de la quela de *C. angulatus*;
- el efecto de salinidad reducida (10 ‰) sobre las actividades de AP presentes en músculo de la quela de *C. angulatus*;
- la posible regulación por mensajeros químicos (DA) de las actividades de AP presentes en músculo de la quela de *C. angulatus* en condiciones de hiperregulación.

El estudio de las respuestas de las actividades de AP bajo condiciones de hiperregulación contribuye a un mejor entendimiento de la complejidad de los mecanismos bioquímicos subyacentes al proceso osmorregulatorio en este cangrejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Tris-(hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina), dopamina (3-hidroxitiamina) y levamisol (L [2,3,5,6]-Tetrahydro-6-phenylimidazol [2,1-b] thiazol) fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); pNP (p-nitrofenol), sacarosa y ácido clorhídrico fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); sulfato de magnesio, Coomassie Blue G250 y pNPP (p-nitrofenilfosfato) fueron de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Machos adultos de *Cyrtograpsus angulatus* (ancho de caparazón mayor a 2,5 cm) en intermuda se recolectaron en la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, 37°32'-37°45'S; 57°19'-57°26'O). Los individuos se transportaron inmediatamente al laboratorio en recipientes con agua del sitio de recolección.

Los cangrejos se mantuvieron en acuarios al menos 10 días a 35 (agua de mar) o 10 ‰ de salinidad (agua de mar diluída con agua destilada). El agua se aireó y filtró permanentemente en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y fotoperíodo (12 h. luz/ 12 h. oscuridad). Los acuarios se cubrieron con nylon negro para reducir disturbios. Los individuos fueron alimentados 3 veces por semana con alimento comercial (Cichlind T.E.N., Wardley, USA: 40 % proteínas, 3 % grasas, 4 % fibras) (0,07 g por individuo) y fueron privados de alimento 48 h antes de los experimentos.

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos fueron crioanestesiados durante 20 minutos. Se cortaron las quelas y se extrajo inmediatamente el tejido muscular de las mismas, el cual se colocó en buffer de homogeneización (Sacarosa 0,25 M / EGTA -Tris 0,5 mM, pH 7,4) (8 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Para cada preparación se trabajó con músculo de ambas quelas extraídas de un único individuo. Los homogenatos se fraccionaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso (medición de proteínas). Antes de ser congeladas, se agregó glicerol (1,3 % v/v) a todas las muestras.

Determinación de la actividad de AP

La actividad de AP se determinó colorimétricamente midiendo la hidrólisis de pNPP en un medio conteniendo SO_4Mg 1mM en buffer Tris 100 mM / HCl (pH 7,4 y 8,0) en ausencia (actividad AP total) y en presencia de levamisol 16 mM (actividad de AP insensible a levamisol). La actividad de AP sensible a levamisol fue estimada como la diferencia entre ambos ensayos.

La cantidad adecuada de proteínas (zona de linealidad de la curva de actividad versus concentración de proteínas del correspondiente homogenato de músculo) (200-350 μg de proteínas) se agregó a la mezcla de reacción y se preincubó 5 minutos a 37° C. La reacción de fosfatasa se inició por la adición de pNPP (concentración final 9,5 mM). La incubación se realizó a 37° C durante 30 min. La reacción se interrumpió mediante el agregado de 2 ml de KOH 0,1 M. El pNP liberado se cuantificó por medición de la absorbancia en 410 nm.

Para otros estudios de caracterización, la actividad de AP se ensayó como se describió anteriormente pero en presencia de distintas concentraciones de pNPP o a diferente pH del medio de reacción según se indica para cada experimento. El efecto de la temperatura sobre la actividad de AP se determinó como se describió previamente pero variando la temperatura de incubación. Se utilizaron individuos aclimatados a 35 ‰ de salinidad para estos experimentos.

La actividad de AP se expresó como $\text{nmoles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre con muestras que no fueron previamente descongeladas. El congelado de las muestras no alteró los valores de actividad.

Estudios “in vitro” de mensajeros químicos sobre las actividades de AP en músculo de la
quela

Se estudió el efecto de la incubación de secciones de músculo durante 30, 60, 90 y 120 min con DA 10^{-4} M sobre las actividades de AP. Para esto, los individuos fueron crioplanados durante 20 min y se extrajo el músculo de ambas quelas, se pesó, se secó y se fraccionó. Se utilizaron 0,1 g de tejido para cada tratamiento. Las secciones de músculo se incubaron a 30 °C con agitación constante (velocidad 6, baño Dubnoff) en medio de incubación (buffer ácido bórico 8,8 mM/Tris pH 7,6, NaCl 330, KCl 9 mM, Mg₂Cl 10 mM) en ausencia (control) o en presencia de DA 10^{-4} M. A distintos tiempos luego de la incubación, se separó el tejido del medio de incubación por centrifugación (Beckman Microfuge) durante 30 s. Posteriormente, se determinaron las actividades de AP en homogenato de músculo de la quela. La composición del medio de incubación utilizado contenía la concentración de los principales osmolitos de la hemolinfa de *C. angulatus* expuestos a 10 ‰ de salinidad (Tabla 6.1).

Determinación de las concentraciones iónicas en hemolinfa

La extracción de hemolinfa y la determinación de iones en hemolinfa se realizó como se describió para *N. granulata* (Capítulo 3, presente Tesis).

Análisis de los resultados

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Para los

estudios de caracterización, se realizó un análisis de varianza para muestras repetidas paramétrico (RM-ANOVA). Para los estudios de salinidad y DA se realizó un análisis de varianza paramétrico (ANOVA de una vía) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Un *a posteriori* ANOVA test (método Holm-Sidak) fue utilizado para identificar diferencias y un $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los resultados del efecto de variaciones en la concentración de pNPP sobre la actividad de AP fueron analizados por medio de un análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 2.01 software). Las curvas mostradas son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) fueron estimados por el análisis de los datos utilizando el gráfico de Lineweaver-Burk (GraphPad Prism 2.01 software). I_{50} (concentración de levamisol a la cual la actividad de AP sensible a levamisol fue inhibida en un 50 %) fue calculada de la curva de inhibición (GraphPad Prism 2.01 software).

RESULTADOS

*Actividades de AP en músculo de la quela de *Cyrtograpsus angulatus*: efecto del pH y levamisol*

La inhibición por levamisol reveló la presencia en músculo de la quela de *C. angulatus* de dos actividades de AP: una actividad sensible a levamisol y una insensible a levamisol (Fig. 6.1). Se determinó la actividad de AP en músculo de la quela de *C. angulatus* dentro del rango de pH de 7,4 a 10,0 en ausencia y en presencia de levamisol 16 mM. La actividad de AP insensible a levamisol no varió dentro del rango de pH de 7,4 a 8,0; disminuyendo alrededor del 64 % a pH 8,4, y mostrando un leve incremento con respecto a pH 8,4 (55 % de la máxima actividad) a pH 9,0 (Fig. 6.2 A). La actividad de AP sensible a levamisol fue alta dentro del rango de pH de 7,4 a 8,4; encontrándose la actividad más alta a pH 8,0 (Fig. 6.2 B). A pH 9,0,

esta actividad fue baja. Ambas actividades mostraron una inhibición de aproximadamente el 96 % a pH 10,0.

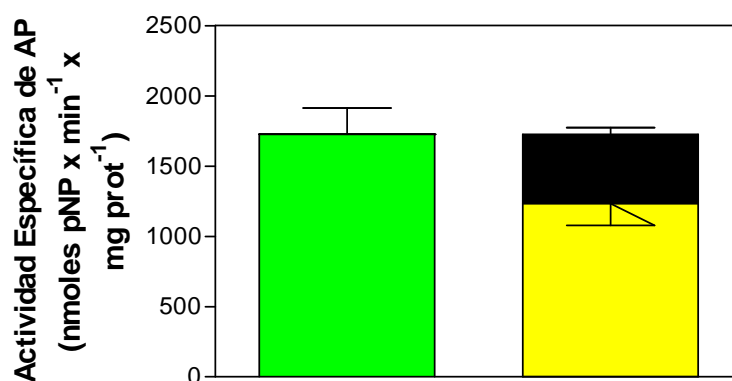


Figura 6.1. Actividades de AP total (■), insensible a levamisol (■) y sensible a levamisol (■) en músculo de la quela de *C. angulatus*. La actividad se midió en presencia y ausencia de levamisol 16 mM. Los datos son la media \pm E.S. para 3 a 4 individuos.

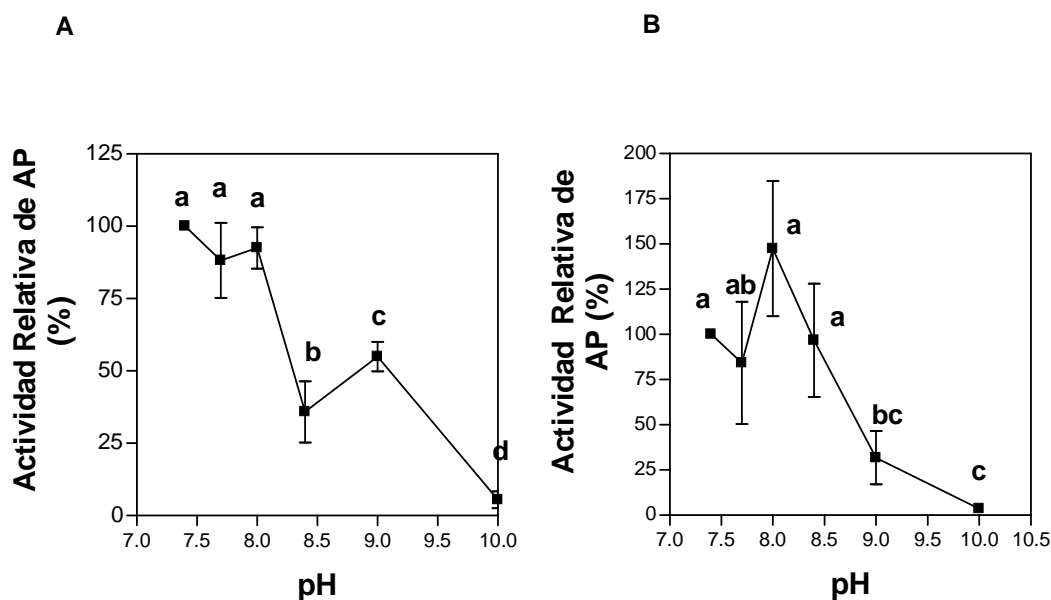


Figura 6.2. Efecto del pH sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en músculo de la quela de *C. angulatus*. Los valores de actividad de AP son expresados como porcentaje de la correspondiente actividad a pH 7,4 (100 %). Los datos son las medias \pm E.S. para 3 a 6 individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

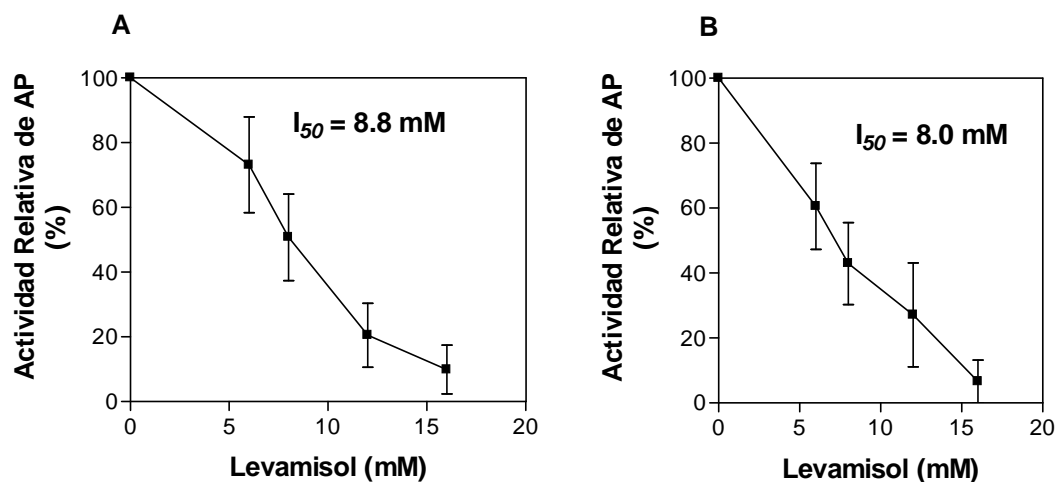


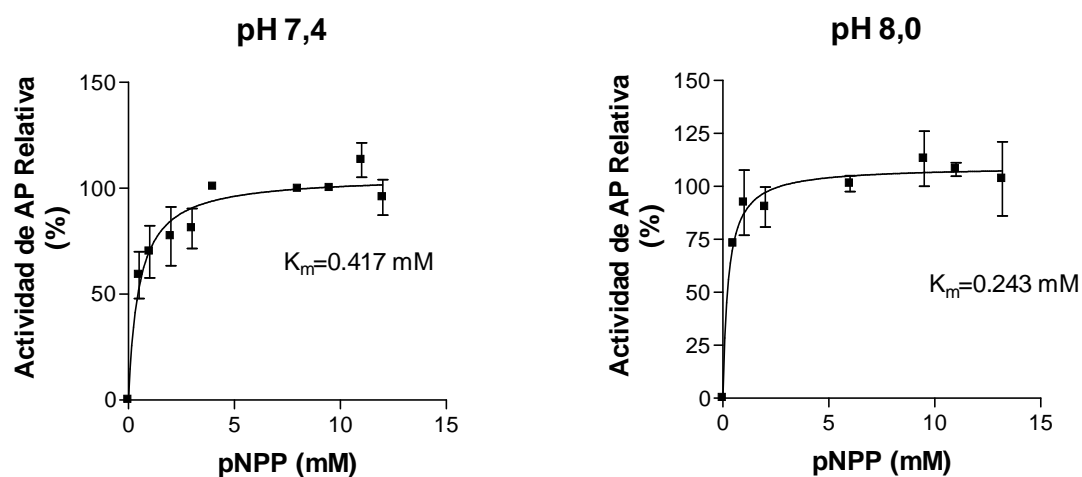
Figura 6.3. Inhibición dependiente de la dosis de levamisol de la actividad de AP sensible a levamisol en músculo de la quela de *C. angulatus* a pH 7,4 (A) y 8,0 (B). La actividad de AP sensible a levamisol en ausencia de levamisol se tomó como el 100 %. I_{50} : concentración de levamisol que produce el 50 % de inhibición de la actividad de AP sensible a levamisol, calculada por GraphPad Prism 2.01. Los valores son las medias \pm E.S. de 3 individuos.

El levamisol produjo una inhibición dependiente de la dosis de la actividad de AP levamisol sensible. I_{50} para el levamisol (concentración que produce el 50 % de la inhibición de la actividad de AP sensible a levamisol) fue similar a pH 7,4 y 8,0 (8,8 y 8,0 mM respectivamente) (Fig. 6.3).

Efecto del pNPP sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus*

Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol exhibieron cinéticas de tipo michaeliana. La actividad de AP insensible a levamisol mostró una K_m menor para el pNPP ($K_m= 0,417$ mM y $0,243$ mM a pH 7,4 y 8,0, respectivamente) que la actividad de AP sensible a levamisol ($K_m= 3,451$ mM y $6,906$ mM a pH 7,4 y 8,0, respectivamente) (Fig. 6.4).

AP Insensible a Levamisol



AP Sensible a Levamisol

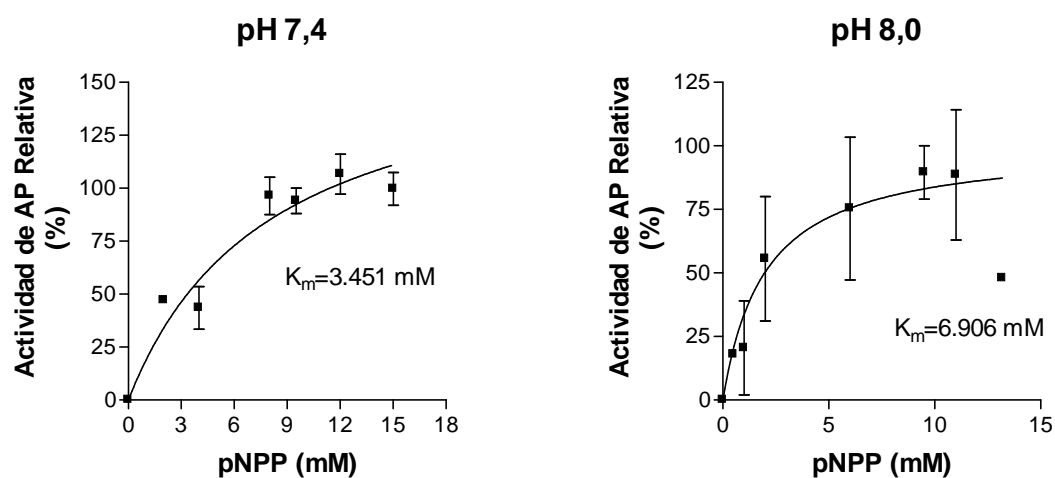
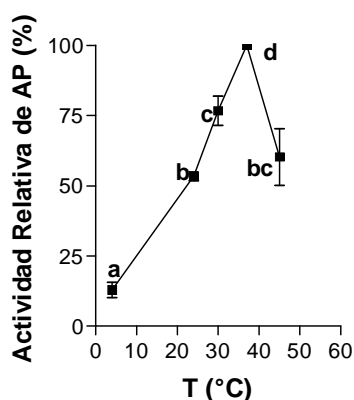


Figura 6.4. Efecto del pNPP sobre las actividades de AP insensible y sensible a levamisol a pH 7,4 y 8,0 en músculo de la quela de *C. angulatus*. Las curvas mostradas son las que mejor ajustan a los datos experimentales. Los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) fueron estimados por el análisis de los datos utilizando el gráfico de Lineweaver-Burk (GraphPad Prism 2.01 software). Los valores de actividad de AP son expresados como porcentaje de la actividad en presencia de pNPP 9,5 mM (100 %). En algunos casos, las barras de error fueron menores que los símbolos usados. Los valores son la media \pm E.S. para 3 individuos.

Efecto de la temperatura sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus*

Las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol fueron fuertemente afectadas por la temperatura del medio de reacción (Fig. 6.5). La actividad de AP insensible a levamisol fue máxima a 37 °C a ambos niveles de pH, disminuyendo a menores y mayores temperaturas. A 4 °C, la actividad fue sólo de aproximadamente el 10 % de la máxima actividad (Fig. 6.5). No se detectó actividad de AP sensible a levamisol a 4 °C a pH 7,4 mientras que fue muy baja a pH 8,0. A temperaturas mayores, la actividad de AP sensible a levamisol a ambos niveles de pH se incrementó, detectándose la máxima actividad a 37°C y disminuyendo alrededor del 60 % a 45°C (Fig. 6.5).

AP Insensible a Levamisol



AP Sensible a Levamisol

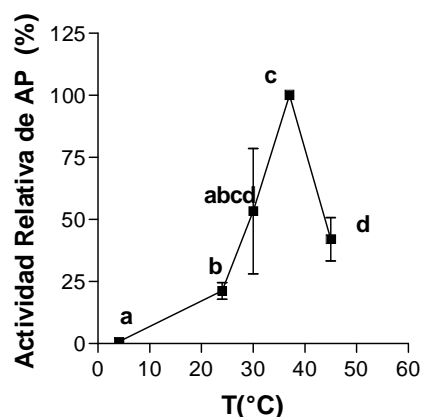


Figura 6.5. Efecto de la temperatura (4-45 °C) sobre las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol a pH 7,4 en músculo de la quela de *C. angulatus*. Los valores de actividad de AP están expresados en relación a la actividad a 37 °C (100 %). En algunos casos, las barras de error fueron menores que los símbolos usados. Los valores son la media \pm E.S. para 3 individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Efecto de la salinidad ambiental sobre las actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus*

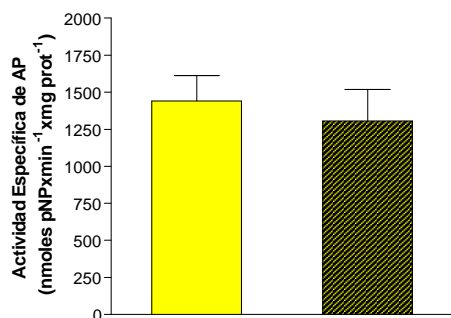
Para determinar el efecto de la salinidad ambiental los cangrejos fueron mantenidos a 35 y 10 ‰ de salinidad, salinidades a las cuales este cangrejo ionoconforma e ionorregula respectivamente (Tabla 6.1). La actividad de AP insensible a levamisol a 35 ‰ de salinidad (1441 ± 170 nmoles pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹) fue similar que a salinidad reducida (Fig. 6.6). En individuos mantenidos a 10 ‰ de salinidad, la actividad de AP sensible a levamisol (548 ± 21 nmoles pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹) fue mayor que la actividad de AP en cangrejos aclimatados a 35 ‰ de salinidad (449 ± 34 nmoles pNP \times min⁻¹ \times mg prot⁻¹) (Fig. 6.6).

Tabla 6.1. Concentración de iones (mEq l⁻¹) en el medio externo y en hemolinfa de *C. angulatus*.

	35 ‰ de salinidad		10 ‰ de salinidad	
	Medio	Hemolinfa	Medio	Hemolinfa
Na ⁺	420,8±18,8	406,7±18,8	179±3,2	332,8±6,6 *
K ⁺	10,2±2,7	7,8±1,9	3,8±0,3	8,6±0,4 *
Cl ⁻	497,6±34,2	440±12,1	152±3,3	363,3±16,1*

*Indica diferencias significativas con la correspondiente concentración del medio externo (p<0.05). Los valores son las medias \pm E.S. para 4 a 9 muestras.

AP Insensible a levamisol



AP Sensible a levamisol

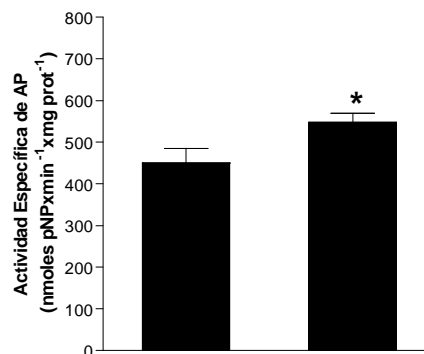


Figura 6.6. Efecto de la exposición a salinidad reducida sobre las actividades de AP insensible a levamisol y sensible a levamisol en músculo de la quela Los valores son la media \pm E.S. para 5 a 7 individuos. Barras llenas: 35 % de salinidad. Barras rayadas: 10 % de salinidad. * Indica diferencias significativas con respecto a la correspondiente actividad a 35 % de salinidad ($p < 0.05$).

Actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus* en presencia de DA “in vitro”

Se estudió el efecto *in vitro* de DA 10^{-4} M sobre las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *C. angulatus* en condiciones de hiperregulación. La DA no afectó ninguna de las dos actividades de AP en músculo a ninguno de los tiempos estudiados (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran la existencia de dos actividades de AP: una actividad insensible a levamisol y una actividad sensible a levamisol, con una respuesta diferencial a la salinidad ambiental, en músculo de la quela del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus*.

El levamisol, un conocido inhibidor de la actividad de AP, es comúnmente utilizado para discriminar entre isoformas de AP en mamíferos (Van Belle, 1976; Calhau et al., 2000; Ali et al., 2006a). En cangrejos eurihalinos, la presencia de una actividad de AP insensible a levamisol y una actividad de AP sensible a levamisol ha sido demostrada en branquias de *Callinectes sapidus* (Lovett et al., 1994). Al igual que en músculo (Capítulo 2, presente Tesis) y hepatopáncreas (Capítulo 4, presente Tesis) del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*, en músculo de *C. angulatus* se demostró la presencia de actividad de AP insensible y sensible a levamisol (Fig. 6.1).

Las AP de diferentes tejidos de invertebrados exhiben un pH óptimo entre 7,1 y 10,9 (Lovett et al., 1994; Itoh et al., 1999; Funk, 2001; Mazorra et al., 2002; Xiao et al., 2002). En *C. angulatus*, las actividades de AP insensible y sensible a levamisol mostraron diferente sensibilidad frente a variaciones en los niveles de pH del medio de reacción, aunque ambas actividades mostraron una alta inhibición a pH 10,0 (Fig. 6.2). La respuesta al pH de las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *C. angulatus* fue diferente a lo descrito para músculo de la quela de *N. granulata* (Capítulo 2, presente Tesis). La actividad de AP insensible a levamisol en músculo de *C. angulatus* mostró ser máxima en un rango de pH de 7,4 a 8,0, este comportamiento fue similar al encontrado para la correspondiente actividad en músculo de *N. granulata*. A diferencia de músculo de *N. granulata*, donde la actividad de AP insensible a levamisol fue baja (Capítulo 2, presente Tesis), a pH 9,0 la actividad de AP insensible a levamisol en músculo de *C. angulatus* fue mayor que a pH 8,4.

El comportamiento cinético de Michaelis-Menten con respecto al pNPP de las actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus* (Fig. 6.4) está de acuerdo con lo descrito para esta actividad en branquias de *C. sapidus* (Lovett et al., 1994), tracto digestivo del cangrejo *Scylla serrata* (Chen et al., 2000), y músculo de la quela de *N. granulata*

(Capítulo 2, presente Tesis). Sin embargo, se encontraron diferencias en los valores de K_m entre la actividad de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *C. angulatus* (Fig. 6.3), sugiriendo una mayor afinidad por el sustrato para la actividad de AP insensible a levamisol al igual que lo observado para músculo de *N. granulata* (Capítulo 2, presente Tesis).

Las AP de diferentes tejidos animales exhiben una sensibilidad variable a la temperatura (Olsen et al., 1991; Àsgeirsson et al., 1995; Funk, 2001; Bortolato et al., 2002). En invertebrados, el óptimo de temperatura de la actividad de AP parece ser dependiente de la especie y del tejido. La respuesta de la actividad de AP insensible a levamisol en músculo de la quela de *C. angulatus* a la temperatura (Fig. 6.5) concuerda con lo encontrado para esta actividad en músculo de *N. granulata* (Capítulo 2, presente Tesis). En músculo de la quela de *C. angulatus* y *N. granulata* las actividades de AP sensible a levamisol fueron mayores a 37°C, pero esta actividad en *C. angulatus* mostró menor sensibilidad a la temperatura que en *N. granulata*.

En animales, varios procesos son regulados por defosforilación de componentes clave (por ej., varias enzimas y sistemas de transporte), mediado por diferentes actividades de fosfatasas, tales como las AP (revisión en Barford, 1999). Por ejemplo, en músculo de la ardilla, se demostró la regulación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa vía la defosforilación por AP (Mac Donald y Storey, 1999).

El rol de la AP como componente de las respuestas a la salinidad ambiental en cangrejos eurihalinos ha sido poco estudiado. Se ha observado la disminución de la actividad de AP sensible a levamisol en branquias de *C. sapidus* aclimatados a baja salinidad (Lovett et al., 1994). En este cangrejo se ha sugerido que la AP branquial podría ser un efector para los cambios adaptativos a la baja salinidad en la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa branquial. Esta regulación por parte de la AP podría efectuarse mediante la síntesis o translocación de

poliaminas, las cuales modulan la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Lovett et al., 1992; 1994). Los resultados de este Capítulo muestran la mayor actividad de AP sensible a levamisol a pH 7,4 en músculo de *C. angulatus* en condiciones de hiperregulación (Tabla 6.1; Fig. 6.6) sugiriendo que esta actividad podría ser un componente a nivel bioquímico de los mecanismos de ajuste a baja salinidad ambiental en este cangrejo. Si el incremento de la actividad de AP sensible a levamisol en músculo de *C. angulatus* en condiciones de hiperregulación tiene una relación fisiológica con el incremento en la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 a), como se sugirió para branquias de *C. sapidus* (Lovett et al., 1994), requiere mayor investigación. Por otro lado, la respuesta a la salinidad ambiental de las actividades de AP en músculo de la quela de *C. angulatus* fue diferente a lo encontrado para músculo de *N. granulata* (Capítulo 3, presente Tesis). Esto sugiere la posible existencia de mecanismos de regulación diferenciales operando en ambos cangrejos en condiciones de hiperregulación. Además, las diferencias en las características bioquímicas en las actividades de AP podría sugerir la existencia de diferentes formas en ambos cangrejos. Queda por ser investigado si la actividad de AP en *C. angulatus* está involucrada en procesos de fosforilación-defosforilación regulando componentes claves involucrados en mecanismos de ajuste a nivel bioquímico a baja salinidad (por ej., regulación del volumen celular, regulación ácido-base, y movilización de sustratos de energía). Así, se han descrito diferentes respuestas fisiológicas durante un estrés hipoosmótico en músculo de cangrejos tales como regulación del volumen celular en las fibras musculares mediante el uso coordinado de iones inorgánicos y aminoácidos libres en *Cancer irroratus*, (Moran y Pierce, 1984), una alcalosis que sugiere un intercambio ácido-base entre los compartimientos intra- y extra-celular en *Eriocheir sinensis* (Whiteley et al., 2001), y movilización de lípidos y actividad gluconeogénica en *N. granulata* (Luvizotto-Santos et al., 2003; Schein et al., 2004; revisión en Bianchini et al., 2008).

DA es uno de los mensajeros que controlan las respuestas a corto plazo a cambios en la salinidad ambiental en cangrejos eurihalinos (revisión en Fingerman et al., 1994; Morris, 2001; Lucu y Towle, 2003). Además, en branquias de varias especies tanto la toma neta de Na^+ como la actividad Na^+/K^+ ATPasa son reguladas por DA (Morris y Edwards, 1995; Mo et al., 1998; Schleich et al., 1999; Morris, 2001; Lucu and Towle, 2003). Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en músculo de la quela de *C. angulatus* no fueron afectadas *in vitro* por DA, a diferencia de lo encontrado *in vivo* para la actividad de AP total a pH 9,0 de este tejido (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 b) sugiriendo que esta amina ejerce una regulación directa de las actividades de AP en músculo de este cangrejo. Sin embargo, se deben realizar mayores estudios (por ej. curvas dosis respuesta, experimentos *in vivo* y en condiciones de osmoconformación) antes de descartar la regulación de estas actividades por DA.

Las diferentes características bioquímicas y la respuesta diferencial de las actividades de AP insensible y sensible a levamisol sugieren la presencia de distintas formas de AP en músculo de la quela de *C. angulatus*. Además, las diferencias en las características bioquímicas, y en la respuesta a salinidad ambiental y DA entre las actividades de AP a pH 7,4 (presente Tesis) y la actividad de AP a pH 9,0 (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003b) sugieren también que la actividad a pH 9,0 podría ser una isoforma de AP distinta, insensible a levamisol, con un rol diferencial asociado a la hiperregulación. Sin embargo, se requieren mayores estudios para determinar la presencia de distintas formas de AP en músculo de este cangrejo.

CAPÍTULO 7:

ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA Y

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN

HEPATOPÁNCREAS DE *Cyrtograpsus angulatus*:

RESPUESTA A SALINIDAD

INTRODUCCIÓN

En cangrejos eurihalinos, los procesos fisiológicos (ej. osmoionorregulación) que les permite a estos organismos soportar los cambios en las condiciones ambientales (ej. salinidad), implican generalmente demandas incrementadas de energía (Kinsey et al., 2003; Stickle et al., 2007; Normant y Gibowicz, 2008). La modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas podría constituir un importante mecanismo de ajuste a nivel bioquímico para maximizar el nivel de ganancia y utilización de energía (Caviedes-Vidal et al., 2000; Casillas-Hernandez et al.; 2002, Johnston, 2003; del Valle et al., 2004; 2006b, Sanchez Paz et al., 2006; Naya et al., 2007, del Valle y López Mañanes, 2008). Distintas actividades de AP y proteolíticas, las cuales participan en el mantenimiento de diversas funciones esenciales del tracto digestivo de invertebrados (Momin y Ragnekeer, 1974; Barker y Gibson, 1977; Van Wormhoudt, 1980; Lovett y Felder, 1990 b; García-Carreño, 1992; García-Carreño et al., 1994; Eguchi et al., 1995; Funk, 2001; Navarrete del Toro et al., 2006; revisión en Muhlia-Almazán et al., 2008), serían enzimas claves en este proceso. Así, un estudio integrativo de las respuestas a nivel digestivo es de fundamental importancia para conocer los mecanismos de ajuste asociados que permiten la adaptación a ambientes heterogéneos.

En la presente Tesis se demostró que el hepatopáncreas de *Neohelice granulata* presenta actividades de AP y proteolítica las cuales son afectadas a tiempos cortos luego de la ingesta de alimento en baja salinidad, sugiriendo que la secreción diferencial de estas enzimas en salinidad reducida podría resultar en una modificación de la capacidad digestiva de *N. granulata* constituyendo así un mecanismo de ajuste secundario a la hiperregulación, posiblemente relacionado con la demanda incrementada de energía en estas condiciones (Capítulo 3).

Trabajos previos en nuestro laboratorio y resultados de la presente Tesis demostraron que *Cyrtograpsus angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita exhibe una alta capacidad hiperregulatoria a corto y largo plazo en condiciones de salinidad reducida (López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003, Capítulo 6, presente Tesis). La respuesta diferencial de la actividad Na^+/K^+ ATPasa en branquias individuales en condiciones de baja salinidad ambiental y luego de un cambio abrupto a salinidad reducida sugiere un rol diferencial de esta enzimas y de branquias anteriores y posteriores en los mecanismos ionorregulatorios en este cangrejo (López Mañanes et al., 2002; Elhalem y López Mañanes, 2003; Elhalem y López Mañanes, 2004). Las respuestas a nivel bioquímico a salinidad ambiental en otros órganos o tejidos de *C. angulatus* han sido poco investigadas. Hemos demostrado la presencia de actividad Na^+/K^+ ATPasa (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 a) y de actividades de AP (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 b; 2004; Capítulo 6, presente Tesis) sensibles a salinidad ambiental en músculo de la quela de *C. angulatus* sugiriendo el rol de estas enzimas y del músculo de la quela en mecanismos de ajuste secundarios a la osmoionorregulación en este cangrejo. Además, estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de ajustes coordinados a nivel bioquímico en *C. angulatus* asociados a la hiperregulación, que podrían implicar demandas diferenciales de energía (ej. cambios en la actividad de ATPasas).

En este contexto, se determinó:

- la existencia de actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *C. angulatus*;
- el efecto de la exposición a salinidad ambiental reducida (10 ‰) sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *C. angulatus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Tris-(hidroximetilamino-metano), EGTA (ácido etilenglicol N', N', N, N-tetracético), SAB (seroalbúmina bovina), levamisol (L [-]-2, 3, 5, 6-Tetrahidro-6-fenilimidazol [2,1-b] tiazol hidrocloreto) y azocaseína fueron de Sigma (St. Louis, Mo., USA); pNP (p-nitrofenol), ácido clorhídrico, cloruro de magnesio y cloruro de sodio fueron de Merck (Darmstadt, Alemania); sulfato de magnesio, cloruro de potasio, Coomassie Blue G250 y pNPP (p-nitrofenilfosfato) fueron de Fluka (Alemania). Otros productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

Captura y mantenimiento de los animales

Se realizó según se describió en el Capítulo 6.

Preparación de extractos enzimáticos

Los cangrejos fueron crioanestesiados durante 20 minutos. Se removió el caparazón, y se extrajo y pesó el hepatopáncreas. El hepatopáncreas se colocó en buffer (Tris 100 mM /HCl pH 7,4; 4 ml de buffer x g de tejido⁻¹) y se homogeneizó en homogeneizador CAT (tool T10) en hielo. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min (Sorval, rotor SS34). Se separó el sobrenadante el cual se fraccionó y almacenó a -20° C hasta su uso. Antes de ser congeladas, se agregó glicerol (1,3% v/v) a todas las muestras.

Determinación de las actividades de AP en hepatopáncreas

La actividad de AP se determinó como se describe en el Capítulo 4 de la presente Tesis.

La actividad de AP se expresó como $\mu\text{moles pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre con muestras que no fueron previamente descongeladas. El congelado de las muestras no alteró los valores de actividad.

Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó como se describe en el Capítulo 4 de la presente Tesis.

La actividad se expresó como unidades de enzima (U) $\times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$. Una U fue definida arbitrariamente como la cantidad de extracto enzimático que produjo un incremento de 1 en la absorbancia en 440 nm.

La determinación de la actividad enzimática se ensayó siempre con muestras que no fueron previamente descongeladas. El congelado de las muestras no alteró los valores de actividad.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (0,96 mg/ml).

Análisis de resultados experimentales

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad de AP se utilizó un análisis de varianza paramétrico para muestras repetidas (RM-ANOVA). Para estudiar el efecto de la salinidad sobre las actividades de AP y proteolítica se utilizó un análisis de varianza paramétrico (ANOVA de una vía) o no paramétrico (Kruskal-Wallis). Se utilizó un test *a posteriori* (método Holm-Sidak) para identificar diferencias y un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Actividad de AP en hepatopáncreas de *Cyrtograpsus angulatus*: respuesta al pH y levamisol

Inicialmente, se determinó la actividad de AP total en hepatopáncreas de *C. angulatus* mantenidos en condiciones de ionoconformación (35 ‰ de salinidad; Tabla 6.1) a pH 8,5 (Fig. 7.1). Posteriormente, se determinó la actividad de AP en hepatopáncreas a pH 8,5 en ausencia y en presencia de levamisol 16 mM (concentración a la que se obtuvo la máxima inhibición de la actividad de AP sensible a levamisol en músculo, Capítulo 6). La inhibición por levamisol reveló la presencia en hepatopáncreas de *C. angulatus* de dos actividades de AP: una actividad sensible a levamisol y una insensible a levamisol (Fig. 7.1).

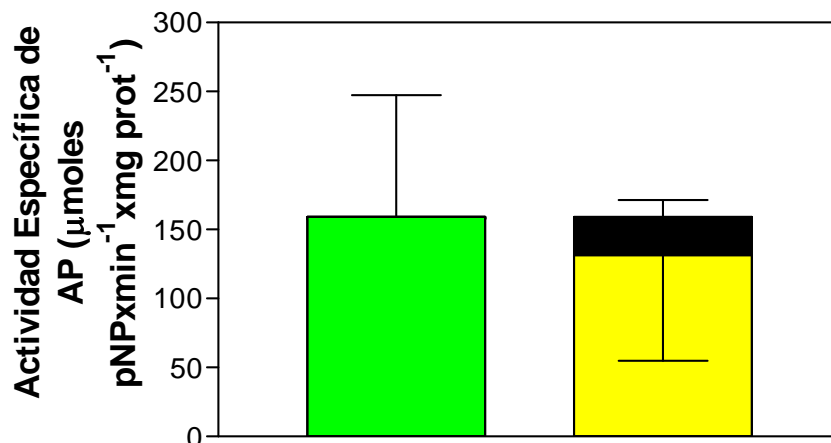


Figura 7.1. Actividades de AP total (■), insensible a levamisol (■) y sensible a levamisol (■) en hepatopáncreas de *C. angulatus*. La actividad se midió en presencia y ausencia de levamisol 16 mM. Los datos son la media \pm E.S. para 3 individuos.

La actividad de AP insensible a levamisol fue similar dentro del rango de pH de 7,7 a 9,5 (Fig. 7.2 A), mientras que a pH 7,4 y 10,0 esta actividad fue de alrededor de un 48 % menor. La actividad de AP sensible a levamisol fue similar dentro del rango de pH de 7,4 a 8,5. A mayores niveles de pH la actividad fue menor, siendo alrededor del 43 % de la máxima actividad a pH 9,0 y de sólo el 4 % a pH 9,5 y 10,0 (Fig. 7.2 B).

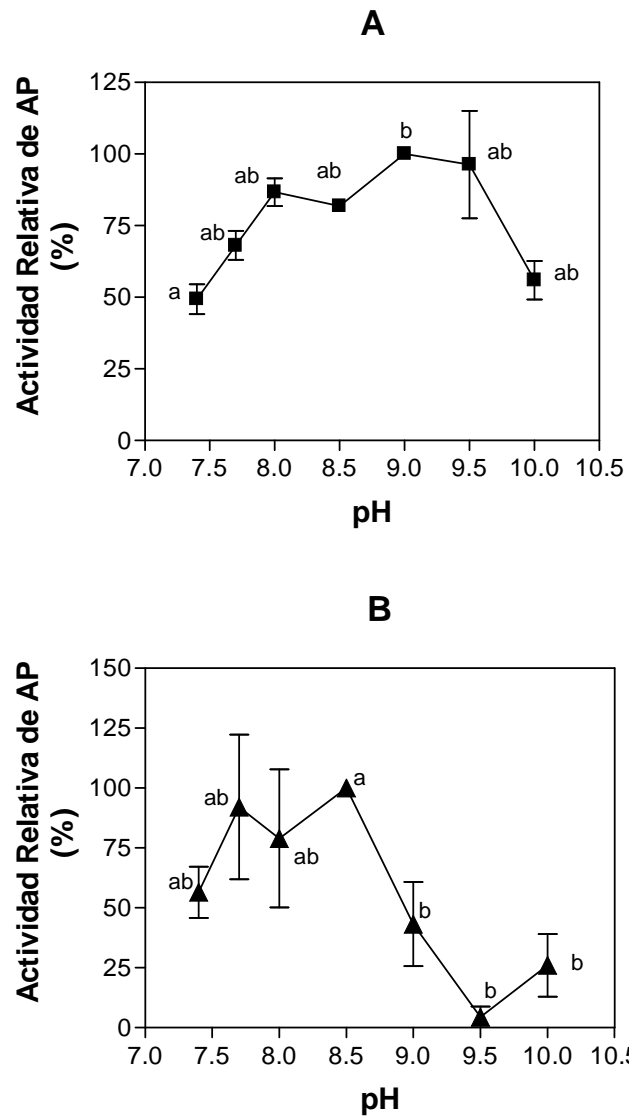


Figura 7.2. Efecto del pH sobre las actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en hepatopáncreas de *C. angulatus*. En algunos casos, las barras de error fueron menores que los símbolos usados. Los valores de actividad de AP son expresados como porcentaje de la correspondiente actividad a pH 8,5 (100 %). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores son las medias \pm E.S. para 3 a 4 individuos.

Actividades de AP en hepatopáncreas de *C. angulatus* expuestos a diferentes condiciones de salinidad ambiental

Se estudió el efecto de la salinidad ambiental sobre las actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas de *C. angulatus* privados de alimento por 48 h. Para esto, individuos de *C. angulatus* se mantuvieron a 35 y 10 ‰, salinidades en las cuales este cangrejo ionoconforma e hiperregula, respectivamente (Capítulo 6, presente Tesis) y se determinaron las correspondientes actividades en hepatopáncreas.

En individuos mantenidos a 35 ‰ de salinidad, el hepatopáncreas exhibió una alta actividad de AP insensible a levamisol ($96,5 \pm 47,2$ $\mu\text{moles de pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) (Fig. 7.3 A). En individuos mantenidos a 10 ‰ de salinidad, esta actividad fue significativamente menor ($8,6 \pm 2,6$ $\mu\text{moles de pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) que la correspondiente actividad a 35 ‰ de salinidad (Fig. 7.3 A).

En 35 ‰ de salinidad, *C. angulatus* exhibió una alta actividad de AP sensible a levamisol en hepatopáncreas ($21,1 \pm 11,2$ $\mu\text{moles de pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) (Fig. 7.3 B). En 10 ‰ de salinidad, esta actividad fue significativamente menor ($1,9 \pm 1,1$ $\mu\text{moles de pNP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) que la correspondiente actividad en 35 ‰ de salinidad (Fig. 7.3 B).

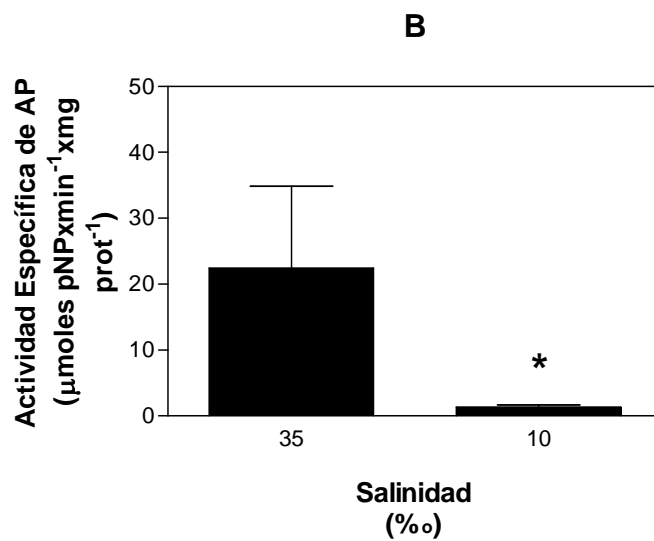
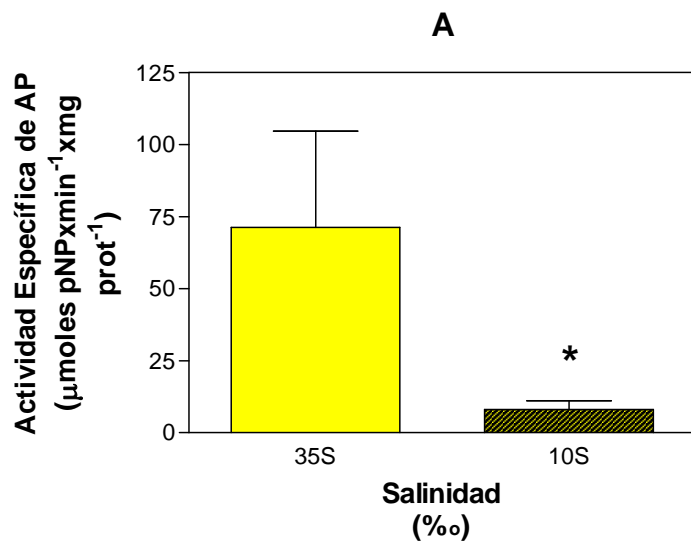


Figura 7.3. Actividades de AP insensible a levamisol (A) y sensible a levamisol (B) en hepatopáncreas de *C. angulatus* a 35 y 10 ‰ de salinidad. Barras llenas: 35 ‰ de salinidad. Barras rayadas: 10 ‰ de salinidad. * Indica significativamente diferente de la correspondiente actividad a 35 ‰ de salinidad. Los valores son la media \pm E.S. para 5 individuos.

Actividad proteolítica en hepatopáncreas de *C. angulatus* expuestos a diferentes condiciones de salinidad ambiental

Se determinó la existencia de actividad proteolítica en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* mantenidos a 35 y 10 ‰ de salinidad. En hepatopáncreas de *C. angulatus*, se detectó actividad proteolítica la cual fue menor en individuos mantenidos a salinidad reducida ($4,6 \pm 1,6 \text{ U x h}^{-1} \text{ x mg prot}^{-1}$) con respecto a individuos mantenidos a 35 ‰ de salinidad ($10,9 \pm 2,2 \text{ U x h}^{-1} \text{ x mg prot}^{-1}$) (Fig. 7. 4).

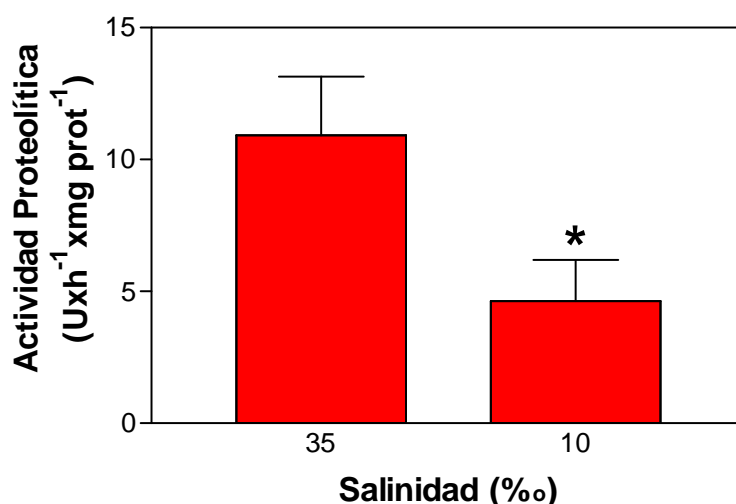


Figura 7.4. Actividad proteolítica en hepatopáncreas de *C. angulatus* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad. Los valores son la media ± E.S. para 5 individuos. * Indica diferencia significativa con respecto a individuos a 35 ‰ de salinidad.

Paralelamente a la medición de las actividades enzimáticas en hepatopáncreas, se determinó la concentración de proteínas en este órgano y la concentración de glucosa en hemolinfa. La concentración de proteínas en hepatopáncreas fue mayor en condiciones de hiperregulación ($29 \pm 6,6 \text{ mg prot x g tejido}^{-1}$) que en condiciones de osmoconformación ($8,3$

± 2) (Fig. 7.5). La concentración de glucosa en hemolinfa fue similar entre individuos mantenidos a 35 y 10 ‰ ($141 \pm 78,8$ y $114,5 \pm 55,6$ μg de glucosa x ml de hemolinfa⁻¹).

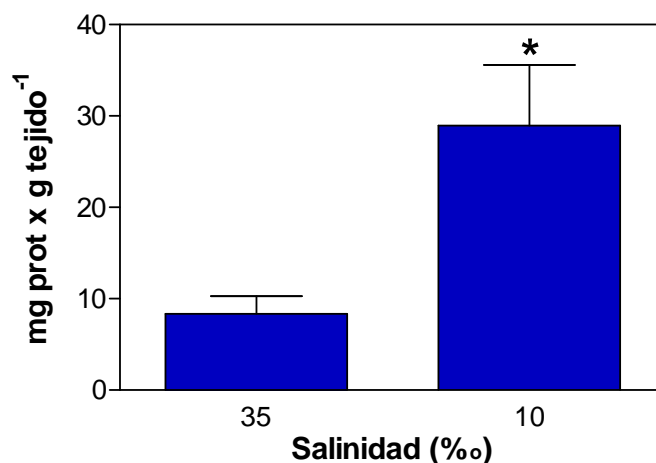


Figura 7.5. Concentración de proteínas en hepatopáncreas de *C. angulatus* a 35 y 10 ‰ de salinidad. Los valores son la media ± E.S. para 5 a 9 individuos. * Indica diferencia significativa con respecto a individuos a 35 ‰ de salinidad.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente Capítulo muestran la presencia de dos actividades de AP: una insensible a levamisol y una sensible a levamisol, y actividad proteolítica en hepatopáncreas de *Cyrtograpsus angulatus* sensibles a la salinidad ambiental.

Las actividades de AP de distintos órganos o tejidos de invertebrados exhiben un amplio rango de pH óptimo (Lovett et al., 1994; Funk et al., 2001; Mazorra et al., 2002; Xiao et al., 2002; Rodrigues et al., 2006). La respuesta al pH de las actividades de AP insensible y sensible a levamisol en hepatopáncreas de *C. angulatus* fue diferente a lo descrito para estas

actividades en branquias posteriores de *Callinectes sapidus* (Lovett et al., 1994), y músculo de la quela y hepatopáncreas de *Neohelice granulata* (Capítulos 2 y 4, presente Tesis). Por otro lado, la diferente respuesta al pH de las actividades de AP en hepatopáncreas con respecto a estas actividades en músculo de este cangrejo (Capítulo 6, presente Tesis) sugiere la posible presencia de distintas isoformas de AP en ambos tejidos.

La mayor actividad específica de las AP en hepatopáncreas con respecto a músculo podría estar relacionada con la multiplicidad de roles del hepatopáncreas (por ej. secreción de enzimas digestivas, digestión y absorción de nutrientes, procesos de detoxificación, movilización y reserva de sustratos de energía) y la participación de AP en estos procesos tal como se sugirió para *N. granulata* (Capítulo 4, presente Tesis).

En crustáceos, se ha demostrado que las enzimas digestivas se encuentran en forma activa en el hepatopáncreas (Barker y Gibson, 1977; Lovett y Felder, 1990 a; Díaz Tenorio et al., 2006; Allardyce y Linton, 2008), son sintetizadas en el hepatopáncreas y posteriormente secretadas durante el proceso de digestión del alimentos (Barker y Gibson, 1977; Lovett y Felder, 1990 a; Díaz Tenorio et al., 2006; Linton et al., 2006; Hehemann, et al., 2007). Las altas actividades de AP y proteolítica encontradas en hepatopáncreas de *C. angulatus* de individuos privados de alimento por 48 h (Figs. 7.3 y 7.4) podría deberse a que estas enzimas ya han sido sintetizadas por ese órgano y aún no han sido secretadas.

En el camarón *Litopenaeus vannamei* se sugirió que la mayor síntesis y liberación de enzimas digestivas podría contribuir con una provisión aumentada de energía necesaria para la osmorregulación (Li et al., 2008). Las menores actividades de AP y proteolítica en individuos de *C. angulatus* expuestos a baja salinidad (Figs. 7.3 y 7.4) sugiere la existencia de ajustes digestivos secundarios a la hiperregulación. Si esto se debe a una mayor secreción de las mismas a partir de este órgano en condiciones de hiperregulación aumentando la provisión de energía como ha sido sugerido para *L. vannamei*, requiere mayor investigación. En

experimentos realizados en paralelo en nuestro laboratorio, se observó una respuesta similar de actividades de amilasa, sacarasa y maltasa en hepatopáncreas de este cangrejo (Asaro, 2009). La secreción de las distintas actividades de enzimas digestivas, a partir de hepatopáncreas, en condiciones de baja salinidad podría constituir un mecanismo de ajuste a nivel digestivo en respuesta a las demandas incrementadas de energía durante la hiperregulación. Además, la respuesta a la exposición a salinidad reducida en *C. angulatus* fue diferente a lo encontrado para *N. granulata*, en el que se no se observó variación en las actividades de AP y proteolítica con respecto a la salinidad en individuos privados de alimento por 48 h (Capítulo 4, presente Tesis). Sin embargo, *N. granulata* mostró el efecto de la salinidad reducida a corto plazo (2 y 4 h) luego de la ingesta de alimento sobre estas actividades enzimáticas (Capítulo 4, presente Tesis). Si la diferencia en la respuesta entre ambos cangrejos está relacionada a diferencias en características o duración del ciclo digestivo queda por ser investigado. En este contexto, se encontró que en crustáceos la liberación de enzimas a partir del hepatopáncreas, la posterior digestión extracelular y la digestión intracelular ocurre a tiempos variables dependiendo de la especie (Dall, 1967; Barker y Gibson, 1977; Barker y Gibson, 1978; Mc Gaw, 2006). Además, se ha reportado para varios crustáceos que las proteasas secretadas en respuesta a la digestión del alimento son posteriormente reabsorbidas (Mc Gaw, 2006). Sin embargo, en *L. vannamei* se ha observado que las mismas proteasas presentes en hepatopáncreas son eliminadas en las heces, sugiriendo que las enzimas secretadas no son reabsorbidas en este camarón (Córdova Murueta et al., 2003). Si la menor actividad proteolítica en hepatopáncreas de individuos de *C. angulatus* a 10 ‰ de salinidad privados de alimento por 48 h se debe a una mayor secreción previa para una mayor degradación de proteínas provenientes de la dieta requiere mayor investigación.

El hecho que se haya observado una mayor concentración de proteínas en el hepatopáncreas de individuos mantenidos en condiciones de hiperregulación (Fig. 7.5) sugiere

que el hepatopáncreas de *C. angulatus* podría constituir un sitio de reserva de proteínas luego de la ingesta de alimento en condiciones de hiperregulación, posiblemente mediante la síntesis *de novo* a partir de precursores provenientes de la dieta. Se sabe que los crustáceos utilizan aminoácidos como fuente de energía (Fox et al., 1994; Shiau, 1998). Así, las proteínas almacenadas en hepatopáncreas podrían ser posteriormente utilizadas como fuente de energía en el proceso hiperregulatorio. Sin embargo, se necesitan mayores estudios para establecer si existe una relación entre la disminución de la actividad proteolítica y actividades de AP en hepatopáncreas de *C. angulatus* en baja salinidad y el incremento observado en la concentración de proteínas.

En conclusión, el hepatopáncreas de *C. angulatus* exhibe altas actividades de AP y proteolítica en hepatopáncreas, las cuales son similarmente afectadas por salinidad reducida. Las menores actividades de AP y proteolítica sugieren su secreción en baja salinidad, lo que podría resultar en una modificación de la capacidad digestiva de *C. angulatus* constituyendo así un mecanismo de ajuste secundario a la hiperregulación. Futuros estudios deberán focalizarse en establecer el rol fisiológico exacto de estas actividades en hepatopáncreas como parte de los complejos mecanismos de flexibilidad fisiológica y bioquímica de *C. angulatus* en relación a la salinidad ambiental.

DISCUSIÓN GENERAL

Los cangrejos eurihalinos que habitan zonas de mareas, aguas costeras y estuarios están expuestos a cambios en factores ambientales, siendo la salinidad uno de los factores claves. Estos organismos presentan mecanismos de ajuste a distintos niveles (bioquímico, fisiológico, morfológico y/o de comportamiento) que les permiten soportar dichos cambios (Kirchner 1991; 2004). Estos mecanismos parecen ser dependientes de la especie, hábitat y tipo de estrés y no siempre se producen en forma conjunta.

Los resultados de la presente Tesis representan un estudio integrativo de los mecanismos de ajuste, a nivel bioquímico, en diferentes órganos (músculo y hepatopáncreas) de los cangrejos eurihalinos *Neohelice granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* de la laguna costera de Mar Chiquita en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y/o fisiológicas.

N. granulata de planicie de marea de la laguna de Mar Chiquita exhibió dos actividades Na^+ ATPasas insensibles a ouabaína (una sensible a furosemida y una insensible a furosemida) (Capítulo 1) coexistentes con la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Pinoni, 2003; Pinoni y López Mañanes, 2003 a) en músculo de la quela. Estas actividades mostraron una respuesta diferencial a baja salinidad (Capítulo 3) y a emersión (Capítulo 5). Así, la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida fue mayor en condiciones de osmoionconformación que en condiciones de hiperregulación y no fue afectada por la emersión, mientras que la actividad Na^+ ATPasa sensible a furosemida no fue afectada por la salinidad pero se incrementó luego de 240 min de emersión. Estos resultados sugieren una participación diferencial de las distintas actividades Na^+ ATPasas presentes en músculo de la quela de *N. granulata* de la laguna de Mar Chiquita en las respuestas a nivel bioquímico frente a estrés por distintos factores ambientales.

Se demostró la existencia de dos actividades de AP en músculo de la quela de *N. granulata* y *C. angulatus*: una actividad insensible a levamisol y una sensible a levamisol (Capítulos 2 y 6). Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol de músculo de *N. granulata* presentaron diferentes características bioquímicas, y respuesta a corto y largo plazo a salinidad ambiental reducida (Capítulos 2 y 3). Así, mientras que la actividad de AP sensible a levamisol no fue afectada por la salinidad, la actividad de AP insensible a levamisol fue menor tanto luego de la exposición a largo plazo a 6 y 10 ‰ de salinidad como luego de un cambio abrupto de 35 a 10 ‰ de salinidad, sugiriendo que la respuesta de esta actividad es dependiente del grado de estrés salino. La emersión no afectó ninguna de las dos actividades de AP en músculo de *N. granulata* (Capítulo 5). Además, se encontraron diferencias en la regulación de las actividades de AP en músculo de *N. granulata* por el segundo mensajero GMPc en condiciones de hiperregulación (10 ‰), sugiriendo la regulación diferencial de ambas actividades enzimáticas por factores intrínsecos (Capítulo 3). Las actividades de AP insensible y sensible a levamisol de músculo de *C. angulatus* también mostraron diferencias en las características bioquímicas y respuesta a salinidad (Capítulo 6). Sin embargo, la respuesta a la exposición a salinidad reducida de las actividades de AP en *C. angulatus* fue diferente a lo encontrado en *N. granulata*. En *C. angulatus*, la actividad de AP sensible a levamisol en músculo de la quela fue mayor a salinidad reducida (10 ‰) con respecto a condiciones de osmoionorregulación y la actividad de AP insensible a levamisol fue similar en ambas salinidades. Estos resultados sugieren el rol diferencial de estas actividades enzimáticas, así como también del músculo, en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación en estos cangrejos.

El hecho que las diferentes actividades enzimáticas de músculo de la quela de *N. granulata* estudiadas en la presente Tesis mostraron distinta respuesta a la salinidad ambiental y emersión, sugiere un rol específico de éstas en distintos mecanismos de ajuste frente a

distintos tipos y grados de estrés ambiental, sugiriendo un alto grado de flexibilidad a nivel bioquímico del músculo de este cangrejo.

En cangrejos eurihalinos, los procesos fisiológicos (ej. osmoionorregulación) que les permite a estos organismos soportar cambios en las condiciones ambientales (ej. salinidad), implican generalmente demandas incrementadas de energía (Kinsey et al., 2003; Stickle et al., 2007; Normant y Gibowicz; 2008). La modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas podría constituir un importante mecanismo de ajuste a nivel bioquímico para maximizar el nivel de ganancia y utilización de energía (Caviedes-Vidal et al., 2000; Casillas-Hernandez et al.; 2002, Johnston, 2003; del Valle et al., 2004; 2006b, Sanchez Paz et al., 2006; Naya et al., 2007, del Valle y López Mañanes, 2008). Distintas actividades de AP y proteolíticas serían enzimas claves en este proceso.

En hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus*, se demostró la presencia de actividad proteolítica y de dos actividades de AP (una insensible a levamisol y una sensible a levamisol) (Capítulos 4 y 7). Estas actividades fueron afectadas post-ingesta en condiciones de hiperregulación y por la emersión en *N. granulata*; y por la exposición a salinidad reducida en *C. angulatus*. La actividad de AP y proteolítica en individuos de *C. angulatus* expuestos a salinidad reducida fue menor que en individuos expuestos a 35 ‰ de salinidad, mientras que en *N. granulata* estas actividades fueron similares a ambas salinidades. En *N. granulata* se observó una menor actividad de AP y proteolítica en hepatopáncreas a tiempos cortos luego de la ingesta de alimento, debido, posiblemente, a una mayor secreción de las mismas, y un incremento de la actividad proteolítica luego de 240 min de emersión. Estos resultados sugieren el rol de estas actividades enzimáticas y del hepatopáncreas en mecanismos de ajuste frente a cambios en las condiciones ambientales posiblemente en relación a demanda diferencial de energía en condiciones de hiperregulación y emersión.

La posible relación funcional entre las diferentes actividades estudiadas en músculo y hepatopáncreas de estos cangrejos en respuesta a distintas condiciones osmoionorregulatorias requiere mayor investigación.

Las diferentes características bioquímicas y respuesta a condiciones ambientales encontradas entre las actividades de AP en músculo y hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* sugieren la existencia de diferentes formas de estas enzimas con diferentes roles fisiológicos en mecanismos de ajuste frente a estrés ambiental en ambos cangrejos y en ambos órganos. Además, las diferencias encontradas en las características bioquímicas y/o respuesta a la salinidad ambiental en músculo y hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* sugiere la existencia de diferencias interespecíficas en los componentes a nivel bioquímico y en los mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación en cangrejos eurihalinos.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que *Neohelice granulata* y *Cyrtograpsus angulatus* exhiben respuestas diferenciales a nivel bioquímico frente a distintas condiciones de salinidad ambiental, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos de ajuste en músculo y hepatopáncreas en relación al estado osmoionorregulatorio en estos cangrejos. *N. granulata* presenta también respuestas a nivel bioquímico a la emersión, sugiriendo la existencia de mecanismos de ajuste secundarios a la emersión en músculo de la quela y hepatopáncreas de este cangrejo. Además, la diferente respuesta encontrada a la salinidad y emersión de las actividades enzimáticas estudiadas sugiere la existencia de mecanismos de ajuste diferenciales a nivel bioquímico frente a distintos tipos de estrés en *N. granulata*.

Los resultados de la presente tesis contribuyen al conocimiento integral de estos cangrejos en particular, y de cangrejos eurihalinos en general, ampliando los conocimientos acerca del rol del músculo, el hepatopáncreas y actividades enzimáticas en relación a variables ambientales clave.

Futuros estudios deberán focalizarse en la interacción de distintas variables ambientales sobre características bioquímicas y fisiológicas de individuos en su ambiente natural y en condiciones controladas de laboratorio permitiendo una mejor comprensión de los complejos mecanismos subyacentes a la flexibilidad fenotípica de *N. granulata* y *C. angulatus* en las respuestas integrativas a variaciones en las condiciones ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahearn, G.A., J.M. Duerr, Z. Zhuang, J.R. Brown, A. Aslamkhan y D.A. Killenbren. 1999. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiol. Biochem. Zool.*, 72: 1-18.
- Airriess, C.N. y B.R. McMahon. 1996. Short term emersion affects cardiac function and regional haemolymph distribution in the crab *Cancer magister*. *J. Exp. Biol.*, 199: 569–578.
- Akiba, Y., M. Mizumori, P.H. Guth, E. Engel y J.D. Kaunitz, 2007. Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293: 1223-1233.
- Ali, A., C.B. Penny, J. Paiker, G. Psaras, F. Ikram y N. Crowther. 2006 a. The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue. *Ann. Clin. Bio.*, 43: 207-213.
- Ali, A., C.B. Penny, J. Paiker, G. Psaras, F. Ikram y N. Crowther. 2006 b. The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3t3-11 cells and human preadipocytes. *Anal. Biochem.*, 354: 247-254.
- Allardyce, B.J. y S.M. Linton. 2008. Purification and characterisation of endo-characterisation endo- β -1,4-glucanase and laminarinase enzymes from the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* and the aquatic crayfish *Cherax destructor*. *J. Exp. Biol.* 211: 2275-2287.
- Al-Wassia, A.H., A.J. Innes, N..M. Whiteley y E.W. Taylor. 1989. Aerial and aquatic respiration in the ghost crab *Ocypode saratan*—I. Fine structure of respiratory surfaces, their ventilation and perfusion; oxygen consumption and carbon dioxide production. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 94: 755-764.
- Anger, K., E.Spivak, C.Bas, D. Ismael y T. Luppi. 1994. Hatching rhythms and dispersion of decapod crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. *Helgol. Meeresunters.*, 48: 445–466.
- Angkawidjaja, C., K. Kuwahara, K. Omori, Y. Koga, K. Takano y S. Kanaya. 2006. Extracellular secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: purification and biochemical characterization. *Protein Eng. Des. Sel.*, 19: 337–343.
- Artillo R., S.A. Pinoni, A. Asaro y A.A. López Mañanes. 2008. Glycogen storage sites in *Chasmagnathus granulatus* upon hyperegulation: differential postingesta response. *Biocell*, 32: 85 (Abstract).
- Asaro, A. 2009. Actividad de amilasa y disacaridasas en los cangrejos estuariales *Chasmagnathus granulatus* y *Cyrtograpsus angulatus*: respuestas a distintas condiciones ambientales. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. (Manuscrito en preparación).

- Àsgeirsson, B., R. Hartemink y J.F. Chlebowski. 1995. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 110: 315–329.
- Balcerzak, M., E. Hamade, L. Zhang, S. Pikula, G. Azzar, J. Radisson, J. Bandorowicz-Pikula y R. Buchet. 2003. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol.*, 50: 1019-38.
- Balslev-Clausen, A., J.M. McCarthy y H.V. Carey. 2003. Hibernation reduces pancreatic amylase levels in ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 134: 573-578.
- Barford, D. 1999. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.*, 27:751-766.
- Barker, P.L. y R. Gibson. 1977. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the european lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 26: 297-324.
- Beltowski, J., A. Jamroz-Wisniewska, J. Nazar y G. Wójcicka. 2004. Spectrophotometric assay of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase and its regulation by leptin and dietary-induced obesity. *Acta Biochim. Polonica*, 51: 1003-1014.
- Beltrame, M.O., S.G. De Marco, J.E. Marcovecchio. 2008. Cadmium and zinc in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina): salinity effects on lethal toxicity in juveniles of the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus*. *Arch. Environ. Cont. Tox.*, 55: 78-85.
- Bhavan, P.S., Geraldine, P. 2004. Profiles of acid and alkaline phosphatases in the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *J. Environ. Biol.*, 25: 213-219.
- Bianchini, A., M. Machado Lauer, L. Nery, E. Pinto Colares, J.M. Monserrat y E.A. dos Santos Filho. 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 151: 423-436.
- Bonting, S.L., 1970. Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase and cation transport. In: Bittar, E. E. (Ed), *Membranes and Ion Transport*, vol. 1. Wiley-Interscience, London, 257-363 pp.
- Borgatti, A.R., Trigari, G., Pagliarani, A. y Ventrella, V. 1985. Ouabaininsensitive Na⁺-stimulation of a microsomal Mg²⁺-ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 81, 127–135.
- Bortolato, M., F. Besson, y B. Roux. 2002. An infrared study of the thermal and pH stabilities of the GPI-alkaline phosphatase from bovine intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292: 874–879.
- Bortolus, A. y O. Iribarne. 1999. Effects of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 178: 79-88.
- Bortolus, A., E. Schwindt y O. Iribarne. 2002. Positive plant-animal interactions in the high marsh of an Argentinean coastal lagoon. *Ecology*, 83: 733–742.

- Boschi, E.E., 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata) 6, 1 – 99.
- Boschi, E.E., 2000. Species of Decapod Crustaceans and their distribution in the American marine Zoogeographic Provinces. Rev. Invest. Desarro. Pesq. (Argentina), 13: 1 – 136.
- Botto F., I. Valiela, O. Iribarne, P. Martinetto y J. Alberti. 2005. Impact of burrowing crabs on C and N sources, control and transformations in sediments and food webs of SW atlantic estuaries. Mar. Ecol. Prog. Ser., 293: 155-164.
- Bozinovic, F., 2003. Fisiología Ecológica y Evolutiva. Teoría y casos de estudio en animales. Santiago. Ediciones Universidad Católica de Chile 1- 531 pp.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-254.
- Brockway R., D. Bowers, A. Hogue, V. Dove y V. Vassele. 2006. A note on salt intrusion in funnel-shaped estuaries: Application to the Incomati estuary, Mozambique. Estuar. Coast. Shelf Sci., 66: 1–5.
- Brooks, S.J., y C.L. Mills. 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Comp. Biochem. Physiol. A, 135: 527–537.
- Calhau, C., F. Martel, C. Hipólito-Reis y Azevedo. 2000. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. Clin. Biochem., 33: 571-577.
- Camejo, J.L., T. Proverbio y F. Proverbio. 1995. Ouabain-insensitive Na(+)-stimulated ATPase activity in rabbit cardiac sarcolemma. Comp. Biochem. Physiol. B, 110: 345-348.
- Cameron, J.N. 1971. Rapid method for determination of total carbon dioxide in small blood samples. J. Appl. Physiol., 31: 632 - 634.
- Caruso-Neves, C., S. Coelho-Souza, D. Vives, G. Goes, L.S. Lara y A.G. Lopes. 2002. Modulation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg²⁺, MgATP and furosemide. Int. J. Biochem. Cell Biol., 34: 1586-1593.
- Caruso-Neves, C. y A.G. Lopes, 2000. Sodium pump in the Malpighian tubules of *Rhodnius* sp. An. Acad. Bras. Ci., 72: 407-412.
- Caruso-Neves, C., J.R. Meyer-Fernandes, J. Saad-Nehme, F. Proverbio, R. Marín y A.G. Lopes. 1998. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. Comp. Biochem. Physiol. B, 119: 807-811.
- Caruso-Neves, C., L.S. Rangel, L.S. Lara y A.G. Lopes. 2001. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. Braz. J. Med. Biol. Res., 34: 1079-1084.
- Caruso-Neves, C., L.P. Souza, C. Chagas y A.G. Lopes. 1997. Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. Biochim. Biophys. Acta, 1329: 336-344.

- Caruso-Neves, C., A.S.E. Siquiera, G. Iso-Cohen y A.G. Lopes. 1999. Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1431: 483-491.
- Caruso-Neves, C., D. Vives, C. Dantas, C.M. Albino, L.M. Fonseca, L.S. Lara, M. Iso y A.G. Lopes. 2004. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1660: 91-98.
- Caseli, L., C. Douglas, R. Masui, P.M. Furriel, F.A. Leone, M.E.D. Zaniquelli, J. Orbulescu y R.M. Leblanc. 2008. Rat osseous plate alkaline phosphatase as Langmuir monolayer—An infrared study at the air–water interface. *J. Colloid Interface Sci.*, 320: 476-482.
- Casillas-Hernández, R., F. Magallón, G. Portillo, O. Carrillo, H. Nolasco y F. Vega-Villasante. 2002. La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. *Rev. Inves. Mar.*, 23:35-40.
- Caviedes-Vidal, E., D. Afik, C. Martinez del Rio y W.H. Karasov. 2000. Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 125: 11 – 24.
- Ceccaldi, H.J., 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Advances In Tropical Aquaculture Tahiti; Aquacop. Ifremer. Actes de Colloque 9*: 243-259.
- Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M. (eds.) *Crustacean Nutrition Vol. VI*: 261-291.
- Chan, J., y R. Stinson 1986. Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 261: 7635– 7639.
- Chapman, P.M., y F. Wang. 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 3–22.
- Chen, H.-T., L.-P. Xie, Z.-Y. Yu, G.-R. Xu y R.-Q. Zhang. 2005. Chemical modification studies on alkaline phosphatase from pearl oyster (*Pinctada fucata*): a substrate reaction course analysis and involvement of essential arginine and lysine residues at the active site. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37: 1446-1457.
- Chen, Q.-X., W. Zhang, H.-R. Wang, H.-M. Zhou. 1996. Kinetic of inactivation of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase during removal of zinc ions by ethylenediaminetetraacetic acid disodium. *Int. J. Biol. Macromol.*, 19: 257-261.
- Chen, Q.-X., W. Zhang, S.-X. Yan, T. Zhang, , H.-M. Zhou. 1997. Kinetic of the thermal inactivation of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*). *J. Enzym. Inhib.*, 12: 123– 131.
- Chen, Q.-X., W.-Z. Zheng, J.-Y. Lin, Z.-T. Cai y H.-M. Zhou. 2000. Kinetic of inhibition of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase by vanadate. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 1105– 1110.
- Chen, Q.-X. y H.-M. Zhou. 1999. Inhibitors of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *J. Enzym. Inhib.*, 14: 251-257.

- Chung, J.S., y S.G. Webster. 2006. Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its second messengers on gills and midgut of the green shore crab, *Carcinus maenas*: a possible osmoregulatory role. *Gen. Comp. Endocrinol.*: 147: 206–213.
- Córdova Murueta, J.H., F.L. García Carreño y M.A. Navarrete del Toro. 2003. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 297: 43– 56.
- Cyboron, G.W., M. Vejins, R. Wuthier, R., 1982. Activity of epiphyseal cartilage membrane alkaline phosphatase and the effects of its inhibitors at physiological pH. *J. Biol. Chem.*, 257: 4141–4146.
- Cyboron, G.W., y R. Wuthier, 1981. Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline Phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 256: 7262– 7268.
- Dall, W. 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae*. Racek and Dall. *Aust. J. Zool.*, 15: 699-714.
- Dall, W., y D.J.W. Moriarty. 1983. Nutrition and digestion. In: Bliss DE, editor. *The Biology of Crustacea Vol. 5. Internal anatomy and physiological regulation*. New York: Academic Press. 215–261 pp.
- de Almeida-Amaral, E.E., C. Caruso-Neves, V.M. Pereira Pires, J.R. Meyer-Fernandes. 2008. *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. *Exp. Parasitol.*, 118: 165–171
- del Castillo, J.R., R. Marin, T. Proverbio y F. Proverbio. 1982. Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 692: 61-68.
- del Castillo, J.R., J.W.L. Robinson, 1985. Mg²⁺-ATP dependent sodium transport transport in inside-out basolateral plasma membranes vesicles from guinea-pig small intestinal epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 812: 402-412.
- del Castillo, J.R., F.J. Romero, L.E. Thomas, L. Carian. 2005. Phosphorylated intermediate of the Na-ATPase associated with Second Sodium pump. *FEBS J.*, 272 (s1).
- del Valle, J.C., C. Busch y A.A. López Mañanes. 2006. Phenotypic plasticity in response to low quality diet in the South American omnivorous rodent *Akodon azarae* (Rodentia: Sigmodontinae). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 145: 397-405.
- del Valle, J.C., y A.A. López Mañanes, 2008. Digestive strategies in the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 150: 387-394.
- del Valle, J.C., A.A. López Mañanes y C. Busch. 2004. Phenotypic flexibility of digestive morphology and physiology of the South American omnivorous rodent *Akodon azarae* (Rodentia: Sigmodontinae). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 139: 503-512.

- Dezi, R.E., E.M. Rodríguez y M.E. Lenge. 1987. Estudios del metabolismo energético en especies del cangrejal de la provincia de Buenos Aires. 1. Tasa metabólica en machos de *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Physis*, 45: 47-60.
- Díaz Tenorio, L.M., F.L. García-Carreño y M.A. Navarrete del Toro. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. *Invertebrate Biol.* 125: 125–135.
- Dópido, R., C. Rodríguez, T. Gómez, N. Acosta, M. Díaz. 2004. Isolation and characterization of enterocytes along the intestinal tract of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Com.Biochem. Physiol.*, 139: 21-31.
- Dore, B., D. Donna, G.E. Andreoletti, L. Savardi y G.A. Lodi. 2000. Specific alkaline phosphatase of amphibia integument levamisole effect on short circuit current (SCC). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 76: 45-50.
- Drach, P. y C. Tchernigovtzeff. 1967. Sur le me`thode de determination des stades d'intermude et son application ge`ne`rale aux crustaces. *Vie Milieu*, 18: 595–607.
- Durand, F., F. Chausson y M. Regnault. 1999. Increases in tissue free amino acid levels in response to prolonged emersion in marine crabs: an ammoniadetoxifying process efficient in the intertidal *Carcinus maenas* but not in the subtidal *Necora puber*. *J. Exp. Biol.*, 202: 2191–2202.
- Durand, F., y M. Regnault. 1998. Nitrogen metabolism of two portunid crabs, *Carcinus maenas* and *Necora puber*, during prolonged air exposure and subsequent recovery: a comparative study. *J. Exp. Biol.*, 201: 2515–2528.
- Dziedziejko V, K. Safranow, D. Slowik-Zylka, A. Machoy-Mokrzynska, B. Millo, Z. Machoy y D. Chlubek. 2005. Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, 31: 26-33.
- Eguchi, M. 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 111: 151 -162.
- Elhalem, L. 2003. Estudios de regulación de la actividad $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ en branquias de *Cyrtograpsus angulatus* y *Chasmagnathus granulata*. Efecto de la salinidad y mensajeros químicos. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. 37 pp.
- Elhalem, L., y A.A. López Mañanes. 2003. Branchial $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity of *Cyrtograpsus angulatus* at different salinities. Effect of serotonin. *Biocell*, 27: 242 (Abstract).
- Elhalem, L., y A.A. López Mañanes, A. 2004. $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ and ionoregulation in *Cyrtograpsus angulatus* from Mar chiquita coastal lagoon. *Biocell*, 28: 226 (Abstract).
- Elumalai, M., Balasubramanian, M. P. 1999. Effect of naphthalene on phosphatases and esterase in muscle and ovary of intermoultmarine edible female crab, *Scylla serrata*. *Water Air Soil Pol.*, 111: 371-376.

- Elumalai, M., C. Antunes y L. Guilhermino. 2005. Alterations of reproductive parameters in the crab *Carcinus maenas* after exposure to metals. *Water Air Soil Pollut.*, 160: 245-258.
- Ewart, H.S., y A. Klip. 1995. Hormonal regulation of Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.*, 269: 295-311.
- Férrille, E. y A. Doucet. 2001. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physil. Rev.*, 81: 345-418.
- Fingerman, M., R. Nagabhushanam, R. Sarojini y P.S. Reddy, 1994. Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *J. Crustac. Biol.*, 14: 413–437.
- Fox, C., H.J. Brown, M. Briggs. 1994. The nutrition of prawns and shrimp in aquaculture—a review of recent research. En: Muir, J.F., Ronald, R.J. (Eds.), *Recent Advances in Aquaculture*, vol. V. Blackwell, Oxford, 131–206 pp.
- Freire, C.A., H. Onken y J.C. McNamara. 2008. Structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 151: 272–304.
- Funk, C.J., 2001. Alkaline phosphatase activity in whitefly salivaryglands and saliva. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46, 165– 174.
- García Carreño, F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Educ.*, 3: 145–150.
- García Carreño, F.L. 1993. Student-friendly classification for proteases. *Biotechnol. Educ.*, 4: 49-53.
- García Carreño, F.L., M.P. Hernández Cortés, N.F. Haard. 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity form the digestive system of a fresh water and marine decapod. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1456-1461.
- Gasser, K.W., y L.V. Kirschner. 1987. The response of alkaline phosphatase to osmoregulatory changes in the trout, *Salmo gairdneri*. *J. Comp Physiol B*, 157: 469-475
- Geddes K., y D.J. Philpott. 2008. A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterol.*, 135: 8-12.
- Genovese, G., C.G. Luchetti y C.M. Luquet. 2004. Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal and concentrated seawater. *Mar. Biol.*, 144: 111-118.
- Genovese, G., M. Senek, N. Ortiz, M. Regueira, D.W. Towle, M. Tresguerres y C.M. Luquet. 2006. Dopaminergic regulation of ion transport in gills of the euryhaline semiterrestrial crab *Chasmagnathus granulatus*: interaction between D1- and D2-like receptors. *J. Exp. Biol.*, 209: 2785-2793.
- Giménez, L. 2003. Potential effect of physiological plastic responses to salinity on population networks of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Helgol. Mar. Res.*, 56: 265-273.
- Goldberg, R.F., W.G. Austen, X. Zhang, G. Munene, G. Mostafa, S. Biswas, M. McCormack, K.R. Eberlin, J.T. Nguyen, H.S. Tatlidede, H.S. Warren, S. Narisawa, J.L. Millán y R.A. Hodin.

2008. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 3551–3556.
- Grady, T., M. Mah'moud, T. Otani, S. Rhee, M.M. Lerch y F.S. Gorelick. 1998. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 275: 1010–1017.
- Halperin, J., M. Ansaldo, G.N. Pellerano y C.M. Luquet. 2000. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851 — physiological and morphological studies. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 126: 341–349.
- Halperin, J., G. Genovese, M. Tresguerres y C.M. Luquet. 2004. Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* by dopamine and cAMP. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 139: 103-109.
- Hansen, G.H., L.-L. Niels-Christiansen, L. Immerdal, B.T. Nystrøm y E.M. Danielsen. 2007. Intestinal alkaline phosphatase: selective endocytosis from the enterocyte brush border during fat absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293: 1325–1332.
- Hara, H., S. Ohyama y T. Hira. 2000. Luminal dietary protein, not amino acids, induces pancreatic protease via CCK in pancreaticobiliary-diverted rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 278: 937–945.
- Hehemann, J.-H., L. Redecke, M. Perbandt, R. Saborowskic y C. Betzela. 2007. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of trypsin-like proteases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Acta Cryst.*, 63: 242–245.
- Henry, R.P. 1994. Morphological, behavioral; and physiological characterization of bimodal breathing crustaceans. *Am. Zool.*, 34: 205-215.
- Hernández-Cortés, P., Cerenius, L., Garcia-Carreño, F., Soderhall, K. 1999. Trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas: purification and cDNA cloning of the synthesized zymogen. *Biol.Chem.*, 380: 499-501.
- Hessle, L., K. Johnson, H.C. Anderson, S. Narisawa, A. Sali, J. Goding, R. Terkeltaub y J.L. Millán. 2002. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 9445–9449.
- Hoemann, C.D., H. El-Gabalawy y M.D. McKee. 2008. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie*, doi:10.1016/j.patbio.2008.06.004. En prensa.
- Holt, S.M., y S.T. Kinsey. 2002. Osmotic effects on arginine kinase function in living muscle of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.*, 205: 1775-1785.
- Holtz, K.M. y E.R. Kantrowitz 1999. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Letters*, 462: 7-11.

- Houlihan, D.F., C.P. Waring, E. Mathers, C. Gray, 1990. Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiol. Zool.*, 63: 735–756.
- Howland, J.L., y I. Faus. 1985. Cation-sensitive ATPase from gills of the salt water mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 81: 551–553.
- Hoylaerts, M., T. Manes y J.L. Millán. 1997. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J. Biol. Chem.* 272 (36), 22781– 22787.
- Hu, K.J., y P.C. Leung. 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopáncreas. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 146: 69–80.
- Icely J.D., y J.A. Nott. 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. In: Harrison FW, Humes AG, editors. *Microscopic anatomy of the invertebrates (Decapod Crustacea)*. Vol. 10. New York: Wiley-Liss. 147–201.
- Iizumi, K., Y. Mikami, M. Hashimoto, T. Nara, H. Yukichi, Y. Hara., T. Auki. 2006. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *BBA*, 1758; 738–746.
- Iribarne, O., Bortolus, A., Botto, F. 1997. Between-habitats differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 155: 132-145.
- Iribarne, O., P. Martinetto, E. Schwindt, F. Botto, A. Bortolus, P. García Borboroglu 2003. Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 296: 167–182.
- Itoh, M., V. Kanamori, M. Takao y M. Eguchi. 1999. Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 121–129.
- Jahn M.P., G.M. Cavagni, D. Kaiser y L.C. Kucharski. 2006. Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 27: 1-9.
- Jaitovich AA, A. M. Bertorello. 2006. Na⁺, K⁺ -ATPase: an indispensable ion pumping-signaling mechanism cross mammalian cell membranes. *Semin. Nephrol.*, 26: 386-92.
- Jing, G., Li Y., L. Xie, R. Zhang. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 144: 184–190.
- Johnston, D.J. 2003. Ontogenetic changes in digestive enzymology of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* Hutton (Decapoda, Palinuridae). *Mar. Biol.* 143:1071–1082.
- Jørgensen, P.L., K.O. Håkansson,, S.J. Karlish. 2003. Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817-849.
- Kaplan, J.H. 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511-35.

- Karasov, W.H. 1986. Energetics, physiology and vertebrate ecology. *Trends Ecol. Evol.* 1: 101-104.
- Kaur, J., S. Madan, A. Hamid, A. Singla y A. Mahmood. Intestinal Alkaline Phosphatase Secretion in Oil-Fed Rats. *Dig. Dis. Sci.*, 52: 665–670.
- Kinsey, S.T., E. Buda y J. Nordeen. 2003. Scaling of Gill Metabolic Potential as a Function of Salinity in the Euryhaline Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Physiol. Biochem. Zool.*, 76: 105–114.
- Kirschner, L.B., 1991. Water and ions. In: Prosser, L. (Ed.), *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Wiley-Liss, London, pp. 13-107.
- Kirschner, L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.*, 207: 1439– 1452.
- Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., Van Wormhoudt., A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the molt cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28: 551-563.
- Kucharski, L.C., V. Schein, E. Capp y R.S.M. Da Silva. 2002. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125: 256–263.
- Lang, M.A., y H. Gainer. 1969. Iso-osmotic intracellular regulation as a mechanism of volume control in crab muscle fibers. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 445-456.
- Lau K.H., J.R. Farley y D.J. Baylink. 1998. Phosphotyrosyl-specific protein phosphatase activity of a bovine skeletal acid phosphatase isoenzyme. Comparison with the phosphotyrosyl protein phosphatase activity of skeletal alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 260: 4653-60.
- Lavariás, S., R.J. Pollero y H. Heras. 2006. Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquat.Toxicol.*, 77: 190-196.
- Lavariás, S., F. García, R.J. Pollero, H. Heras. 2007. Effect of the water-soluble fraction of petroleum on microsomal lipid metabolism of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). *Aquat. Toxicol.*, 82: 265-271.
- Lee, K.-Y., A.P. Valaitis y D.L. Denlinger. 1998. Activity of gut alkaline phosphatase, proteases and esterase in relation to diapause of pharate first instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 37: 197 – 205.
- Lemos D., M.P. Hernández Cortés, M.A. Navarrete del Toro, F.L. García Carreño y V.N. Phan. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Mar. Biol.*, 135: 653–662.
- Li, E., L. Chen, C. Zeng, N. Yu, Z. Xiong, X. Chen y J.G. Qin. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274: 80–86.

- Linton, S.M., P. Greenaway y D.W. Towle. 2006. Endogenous production of endo-*b*-1,4-glucanase by decapod crustaceans. *J. Comp. Physiol. B*, 176: 339–348.
- López Mañanes, A.A., L.J. Magnoni y A.L. Goldemberg. 2000. Branchial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 127: 85–95.
- López Mañanes, A.A., C.D. Meligeni y A.L. Goldemberg. 2002. Response to environmental salinity of Na⁺–K⁺ ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 274: 75–85.
- Lovett, D. y D.L. Felder. 1990 a. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.*, 178: 144–159.
- Lovett, D., y D.L. Felder. 1990 b. Ontogenetic Changes in Enzyme Distribution and Midgut Function in Developmental Stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.*, 178: 160–174.
- Lovett, D., D. Towle y J. Faris. 1994. Salinity-sensitive alkaline phosphatase activity in gills of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp. Biochem. Physiol B*: 109: 163–173.
- Lovett, D., S.A. Watts, R.F. Ott y B.E. Smith. 1992. Effect of acclimation salinity on Na⁺/K⁺ ATPase activity and polyamine concentration in gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Am. Zool. A*, 32: 58 (Abstract).
- Lovett, D., M.P. Verzi, J.E. Burgents, C.A. Tanner, K. Glomski, J.J. Lee y D.W. Towle. 2006. Expression profiles of Na⁺,K⁺-ATPase during acute and chronic hypo-osmotic stress in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.*, 211: 58–65.
- Lucu, C., J. Pavicic, D. Iivankovic, D. Pavicic-Hamer y M. Najdek. 2008. Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 149: 362–372.
- Lucu, C., y D.W. Towle. 2003. Na⁺ + K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 135: 195–214.
- Luquet, C. M., y M. Ansaldo. 1997. Acid-base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 117: 407–410.
- Luquet, C.M., C.O. Cervino, M. Ansaldo, V. Carrera Pereyra, S. Kocmur y R.E. Dezi. 1998. Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 121: 385–393.

- Luquet, C.M., U. Postel, J. Halperin, M. Urcola, R. Marques y D. Siebers. 2002. Transepithelial potential differences and Na⁺ flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. *J. Exp. Biol.*, 205: 71-77.
- Luquet C.M., D. Weihrauch, M. Senek, D.W Towle. 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.*, 208: 3627-3636.
- Luvizotto-Santos, R., J. Lee, Z. Branco, A. Bianchini y L Nery. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool. A*, 295: 200–205.
- Mac Donald, J.A., y K.B. Storey. 1999. Regulation of ground squirrel Na⁺K⁺-ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254: 424–429.
- Maciel, J.E.S., F. Souza, S. Valle, L.C. Kucharski y R.S.M. da Silva. 2008. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 151: 61–65.
- Mahmood, A., J.S. Shao y D.H. Alpers. 2003. Rat enterocytes secrete SLPs containing alkaline phosphatase and cubilin in response to corn oil feeding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 285: 433–441.
- Majhi, S.K., S. Naskar y B.K. Mandal. 2006. Kinetic of alkaline phosphatase in liver, kidney, intestine and muscle tissue of red tilapia cultured under mid-hill altitudes of Meghalaya: North Eastern India. *Pak. J. Biol. Sci.*, 9: 1112-1115.
- Mahmood, A., F. Yamagishi, R. Eliakim, K. DeSchryver-Kecsckemeti, T.L. Gramlich y D.H. Alpers. 1994. A possible role for rat intestinal surfactant-like particles in transepithelial triacylglycerol transport. *J. Clin. Invest.*, 93: 70–80.
- Marcovecchio, J., H. Freije, S. De Marco, A. Gavio, O. Beltrame y R. Asteasuain. 2006. Seasonality of hydrographic variables in a coastal lagoon: Mar Chiquita, Argentina. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 15: 180-191.
- Marin, R., D.C. Gómez, G.A. Rodriguez, T. Proverbio y F. Proverbio. 1990. Ouabain-insensitive, Na-ATPase activity in pure suspensions of rat kidney proximal tubules. *FEBS*, 269: 77-78.
- Mazorra, M.T., J.A. Rubio y J. Blasco. 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 131: 241– 249.
- McComb, R.B., G.N., Bowers y S. Posen. 1979. *Alkaline Phosphatase*. Plenum Press, New York.
- McGaw, I.J. 2006. Feeding and digestion in low salinity in an osmoconforming crab, *Cancer gracilis* II. Gastric evacuation and motility. *J. Exp. Biol.*, 209: 3777-3785.

- McGaw, I.J. 2007. Marine and freshwater behaviour and physiology. *Mar. Freshw. Behav. Phy.*, 40: 117–131.
- McGaw, I.J., y C.L. Reiber. 2000. Integrated physiological responses during feeding and digestion in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.*, 203: 359–368.
- McMullen, D.C. y K.B. Storey. 2008. Suppression of Na⁺K⁺-ATPase activity by reversible phosphorylation over the winter in a freeze-tolerant insect. *J. Insect Physiol.*, 54: 1023-1027.
- Medesani, D.A., L.S. López Greco y E.M. Rodríguez. 2001. Effects of cadmium and copper on hormonal regulation of glycemia by the eyestalks, in the crab *Chasmagnathus granulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 71-76.
- Medesani, D.A., L.S. López Greco y E.M. Rodríguez. 2004. Disruption of endocrine regulation of glycemia levels by cadmium and copper in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 73: 942-946.
- Mente, E., A. Legeay, D.F. Houlihan y J.C. Massabuau. 2003. Influence of oxygen partial pressure on protein synthesis in feeding crabs. *Am. J. Physiol., Regulatory Integr. Comp. Physiol.*, 284: 500–510.
- Milan, A., R. Waddington, G. Embery. 2001. Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity in vitro with potential implications for dentine mineralization. *Arch. Oral Biol.*, 46: 343– 351.
- Mo, J.L., Devos, P., Trausch, G., 1998. Dopamine as a modulator of ionic transport and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J. Crustac. Biol.* 18: 442–448.
- Mobasher, A., J. Avila, I. Cózar-Castellano, M.D. Brownleader, M. Trevan, M. Francis, J. Lamb y P. Martín-Vasallo. 2000. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.*, 20: 51-91.
- Momin, M.A. y P.V. Rangneker. 1974. Histochemical localization of acid and alkaline phosphatases and glucose-6-phosphatase of the hepatopancreas of the crab, *Scylla serrata* (Forskål). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 14: 1-16.
- Moran, W.M. y S.W. Pierce. 1984. The mechanism of crustacean salinity tolerance: cell volume regulation by K⁺ and glycine effluxes. *Mar. Biol.*, 81: 41-46.
- Moretti, R., M. Martín, T. Proverbio, F. Proverbio y R. Marín. 1991. Ouabain-insensitive Na-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 98: 623-626.
- Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.*, 204: 979–989.

- Morris, S., y T. Edwards. 1995. Control of osmoregulation via regulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity in the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 112: 129–136.
- Moss, D.W. 1992. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem.*, 38: 2486-2492.
- Mota, A., P. Silva, D. Neves, C. Lemos, C. Calhau, D. Torres, F. Martel, H. Fraga, L. Ribeiro, M.N.M.P. Alçada, M.J. Pinho, M.R. Negrão, R. Pedrosa, S. Guerreiro J.T. Guimarães, I. Azevedo y M.J. Martins. 2008. Characterization of rat heart alkaline phosphatase isoenzymes and modulation of activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 41: 600-609.
- Muginova, S.V., A.M. Zhavoronkova, A.E. Polyakov y T.N. Shekhovtsova. 2007. Application of Alkaline Phosphatases from Different Sources in Pharmaceutical and Clinical Analysis for the Determination of Their Cofactors; Zinc and Magnesium Ions. *Anal. Sci.*, 23: 357-363.
- Muhlia-Almazán, A., y F.L. García Carreño. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 133: 383–394.
- Muhlia-Almazán, A., A. Sánchez Paz y F.L. García Carreño. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J. Comp. Physiol. B*, 178: 655–672
- Nakano, T., T. Shimanuki, M. Matsushita, I. Koyama, I. Inoue, Katayama, D.H. Alpers y T. Komoda. 2006. Involvement of intestinal alkaline phosphatase in serum apolipoprotein B-48 level and its association with ABO and secretor blood group types. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 341: 33-38.
- Narisawa S, L. Huang, A. Iwasaki, H. Hasegawa, D.H. Alpers y J.L. Millán. 2003. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol. Cel. Biol.*, 23: 7525-7530.
- Navarrete del Toro M.A., F.L. García-Carreño, L.M. Díaz, L. Celis-Guerrero y R. Saborowski. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *J. Exp. Zool. A*, 305: 645–654.
- Naya D., F. Bozinovic y W. Karasov. 2007. Gut size flexibility in laboratory mice and rats: A meta-analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 148: 133-134.
- Normant, M., y M. Gibowicza. 2008. Salinity induced changes in haemolymph osmolality and total metabolic rate of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi* Gould, 1841 from Baltic coastal waters *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 355: 145-152.
- Ohkubo, A., N. Langerman y M.M., Kaplan. 1974. Rat liver alkaline phosphatase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 249: 7174–7180.
- Oliveira, G.T., y R.S.M., da Silva, 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chamagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 127: 375–381.

- Oliveira, G.T., I.C.C. Rossi, L.C. Kucharski, y R.S.M. da Silva, 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs maintained on a high protein or carbohydrate rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 137: 383-390.
- Olsen, R.L., K. Øvervø y B. Myrnes. 1991. Alkaline Phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): a dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 99: 755-761.
- Onken, H., y S. Riestenpatt. 1998. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 119: 883- 893.
- Onken H., Schöbel A., Kraft J., Putzenlechner M. 2002. Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*: stimulation by eyestalk extract. *J. Exp. Biol.*, 203: 1373-1381.
- Pagliarani, A., P. Bandiera, V. Ventrella, F. Trombetti, M.P. Manuzzi y A.R. Borgatti. 2008. Response of Na⁺-dependent ATPase Activities to the Contaminant Ammonia Nitrogen in *Tapes philippinarum*: Possible ATPase Involvement in Ammonium Transport. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 55: 49-56.
- Pagliarani, A., P. Bandiera, V. Ventrella, F. Trombetti, M. Pirini y A.R. Borgatti, 2006. Response to alkyltins of two Na⁺-dependent ATPase activities in *Tapes philippinarum* and *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicol. in Vitro*, 20 : 1145-1153.
- Pagliarani, A., V. Ventrella, F. Trombetti, M. Pirini, G. Trigari y A.R. Borgatti. 1996. Mussel microsomal Na⁺, Mg²⁺-ATPase sensitivity to waterborne mercury, zinc and ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 113: 185-191.
- Park, Y.-D., Yang, Y., Chen, Q.-X., Lin, H.-N., Liu, Q. y H.-M. Zhou. 2001. Kinetics of complexing activation by the magnesium ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem. Cell. Biol.*, 79: 765-772.
- Pekarthy, J.M., J. Short, A.I. Lansing y I. Lieberman. 1972. Function and control of liver alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 247: 1767-74.
- Perera, E., F.J. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, E. Alonso, O. Carrillo y G.S. Galich. 2008. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus arhus*. *Comp. Biochem. Physiol B*, 150: 247-254.
- Piersman, T., y J. Drent. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 228-233.
- Pinoni, S. A. 2003. Actividades de Na⁺/K⁺ ATPasa y de Fosfatasa Alcalina en músculo de *Cyrtograpsus angulatus* y *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae). Tesis de Grado, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. 39 pp.

- Pinoni, S.A., y A.A. López Mañanes. 2003 a. Na⁺-K⁺ ATPase Activity of Muscle of *Cyrtograpsus angulatus* and *Chasmagnathus granulata* from Mar Chiquita Lagoon (Bs. As. Province). *Biocell*, 27: 242 (Abstract).
- Pinoni, S.A., y A.A. López Mañanes, 2003 b. Salinity Sensitive Alkaline Phosphatase Activity of Muscle of *Cyrtograpsus angulatus* from Mar Chiquita Lagoon: Response to Dopamine. *Biocell*, 37: 242 (Abstract).
- Pinoni, S.A., y A.A. López Mañanes. 2004. Alkaline Phosphatase activities with differential response to environmental salinity in muscle of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* from Mar chiquita coastal lagoon. *Biocell*, 28: 225 (Abstract).
- Proverbio F., R. Marin y T. Proverbio. 1991. The ouabain-insensitive sodium pump. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 99: 279–283.
- Proverbio F., T. Proverbio y R. Marin. 1986. Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺+ K⁺)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 858: 202–205.
- Register, T.C., y R.E. Wuthier. 1984. Effect of vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ⁴⁵Ca and ³²Pi uptake by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.*, 259: 3511 – 3518.
- Resch-Sedlmeier, G., y D. Sedlmeier. 1999. Release of digestive enzymes from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 123: 187–192.
- Robaldo, R.B., J.M. Monserrat, J.C.B. Cousin, y A. Bianchini. 1999. Influence of metacercariae (Digenea: Microphallidae) in the hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda: Grapsidae). *Diseases Aquat. Organisms*, 37: 153–157.
- Rodrigues, M.C.A., L.H. Souza Guimaraes, J.L. Liberato, M.L.T. de Moraes Polizeli y W. F. dos Santos. 2006. Acid and alkaline phosphatase activities of a fraction isolated from *Parawixia bistriata* spider venom. *Toxicon*, 47: 854–858.
- Romero, F.J., M.A. Rocafull, L.E. Thomas, J.R. Castillo. 2005. The second sodium pump: isolation and characterization. *FEBS J.*, 272 (s1).
- Rosas, C., A. Bolongaro-Crevenna, A. Sanchez, G. Gaxiola, L. Sot y E. Escobar. 1995. Role of Digestive Gland in the Energetic Metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.*, 189: 16-174.
- Sabat, P., J.A. Lagos y F. Bozinovic. 1999. Test of the adaptative modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 123: 83-87.
- Saborowski, R., S. Thatje, J.A., Calcagno, G.A. Lovrich y K. Anger. 2006. Digestive enzymes in the ontogenetic stages of the southern king crab, *Lithodes santilla*. *Mar. Biol.*, 149: 865–873.

- Sainz, J.C., García-Carreño, F.L., Sierra-Beltrán, A., Hernández-Cortés, P. 2004. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the digestive gland of the shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Crust. Biol.*, 24: 266-273.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, A. Muhlia-Almazan, A. Peregrino-Uriarte, J. Y G. Yepiz-Plascencia. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 36: 241-9.
- Santos, E.A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 88: 21-25.
- Schein, V., A.L. Fernandes Chittó, R. Etges, L.C. Kucharski, A. van Wormhoudt y R. da Silva. 2005a. Effect of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acids uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 140: 561-567.
- Schein, V., A.L. Fernandes Chittó, R. Etges, L.C. Kucharski, A. van Wormhoudt y R. da Silva. 2005b. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 316: 203–212.
- Schein, V., Y. Wache, R. Etges, L.C. Kucharski, A. van Wormhoudt y R. da Silva. 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Lett.*, 561: 202– 206.
- Scheiner-Bobis, G. 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.*, 269: 2424-2433.
- Schick, J., R. Verspohl, H. Kern y G. Scheele. 1984. Two distinct adaptive responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 247: 611-616.
- Schleich, C.E., A.L. Goldemberg y A.A. López Mañanes. 2001. Salinity dependent Na^+/K^+ ATPase activity in gills of euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Gen. Physiol. Biophys.* 20: 255-256.
- Schleich, C.E., López Mañanes, A.A., Goldemberg, A.L., 1999. Regulación por mensajeros químicos de la actividad Na^+/K^+ ATPasa branquial de *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decápoda) de la laguna costera de Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires) en condiciones de salinidad reducida. En: Trisierra, A.E., Aguilar, Z.G. (Eds.), COLACMAR, vol. 1. Culquichicón Malpica, Perú, pp. 529– 530.
- Schmitt, A.S.C., y E.A. Santos. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Custacea-Decapoda) during emersion. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 106: 329-336.

- SenthilKumar, P., K. Samyappan, S. Jayakumar y M. Deecaraman. 2007. Impact of Heavy Metal Copper on the Neurosecretory Cells in a Freshwater Field Crab, *Spiralothelphusa hydrodroma*. Res. J. Agr. Biol. Sci., 3: 584-589, 2007.
- Seo, J.S., K.-W. Lee, J.-S. Rhee, D.-S. Hwang, Y.-M. Lee, H.G. Park, I.-Y. Ahn y J.-S. Lee. 2006. Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. Aquat. Toxicol., 80: 281–289.
- Sharp, C.M., C. Linder y P. Magnusson. 2007. Analysis of human bone alkaline phosphatase isoforms: Comparison of isoelectric focusing and ion-exchange high-performance liquid chromatography. Clin. Chim. Acta, 379: 105–112.
- Shiau, S.-Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. Aquaculture, 164: 77–93.
- Simao, A.M.S., M.M. Beloti, A.L. Rosa, P.T. de Oliveira, J.M. Granjeiro, J.M. Pizauro, P. Ciancaglini. 2007. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: A useful source of alkaline phosphatase. Cell Biol Int., 31: 1405-1413.
- Skou, J.C., 1997. The identification of the sodium pump. Biosci. Rep., 18: 437-451.
- Smullen, R.P., J. A. David y R.M. Pitman. 1996. Endocrine regulation of the phosphatidylinositol pathway in the norway lobster, *Nephrops norvegicus*, and the shore crab, *Carcinus maenas*. Gen. Comp. Endocrinol., 104: 84-91.
- Spivak, E. 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Invest. Mar. Valparaíso, 25: 105-120.
- Spivak E., Anger K., Luppi T., Bas C. y Ismael D. 1994. Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita lagoon (Pcia. Bs As. Argentina). Helgol. Meeresunters., 48: 59-78.
- Stickle, W.B., H. J. Wyler y T.H. Dietz. 2007. Effects of salinity on the juvenile crab physiology and agonistic interactions between two species of blue crabs, *Callinectes sapidus* and *C. similis* from coastal Louisiana. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 352: 361-370.
- Sukhanova, M.Z., L.G. Grenback, N.E. Gruntenko, T.M. Khlebodarova y I.Y. Rauschenbach. 1996. Alkaline phosphatase in *Drosophila* under heat stress. J. Insect Physiol., 42: 161–165.
- Therien, A. G. y Blostein, R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 279: 541-566.
- Thomas, L.E., L. Burguillos y J.R. del Castillo. 2003. Backdoor phosphorylation of basolateral plasma membranes of small intestinal epithelial cells: characterization of a furosemide-induced phosphoprotein related to the second sodium pump. Arch. Biochem. Biol. Phys., 419: 90-197.
- Tilgar, V., P. Kilgas, A. Viitak y J. Reynolds. 2008. The Rate of Bone Mineralization in Birds Is Directly Related to Alkaline Phosphatase Activity. Physiol. Biochem. Zool., 81:106–111.

- Torres, G., M. Charmantier-Daures, S. Chifflet y K. Anger. 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 147: 460-465.
- Towle, D. W., 1993. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *J. Exp. Zool.*, 265: 387-396.
- Towle, D. W., 1997. Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. *Am. Zool.*, 37: 575-584.
- Towle, D. W. y Weihrauch, D. 2001. Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am. Zool.*, 41: 770-780.
- Tresguerres, M., S.K. Parks, S.E. Sabatini, G.G. Goss y C.M. Luquet. 2008. Regulation of ion transport by pH and [HCO₃⁻] in isolated gills of the crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294: 1033-1043.
- Tsai, R.J., H.C. Lin. 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.*, 210, 620-627.
- Van Belle, H. 1976. Alkaline phosphatase. i. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin. Chem.*, 22: 972-6.
- Van Wormhoudt, A. 1973. Variation des protidases, des amylases et des protidines solubles au cours du développement larvaire chez *Palaemon serratus*. *Mar. Biol.*, 19: 245-248.
- Van Wormhoudt, A., H.J. Ceccaldi y B.J. Martin. 1980. Adaptation of the level of hepatopancreatic digestive enzymes in *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) to the composition of experimental diets. *Aquaculture*, 21: 63-78.
- Ventrella, V., A. Pagliarani, F. Trombetti, M. Pirini, G. Trigari, G. y A.R. Borgatti. 2001. Response of rainbow trout gill Na⁺-ATPase to T₃ and NaCl administration. *Physiol. Biochem. Zool.*, 74: 694-702.
- Ventrella, V., F. Trombetti, A. Pagliarani, G. Trigari y A.R. Borgatti. 1990. Gill (Na⁺+K⁺)-and Na⁺-stimulated Mg²⁺-dependent ATPase activities in the gilthead bream *Sparus auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 95: 95-105.
- Ventrella, V., Trombetti, F. Pagliarani, A., Trigari, G., Pirini, M., Borgatti, A.R., 1992. Salinity dependence of the ouabain-insensitive Mg²⁺-dependent Na⁺ ATPase in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) adapted to fresh and brackish water. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 101: 1-7.
- Vijayavel, K., y M.P. Balasubramanian. 2006. Interaction of potash and decis in the ecophysiology of a freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 66: 154-158.
- Vinagre, A.S. y R.S.M. da Silva. 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Can. J. Zool.*, 80: 1413-1421.

- Vitale, A.M., J.M. Monserrat, P. Castilho, E.M. Rodríguez. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 122: 121-129.
- Warnes, T.W. 1972. Alkaline phosphatase. *Gut*, 13: 926-937.
- Weichell, M., R. Jaussi, C. Rhyner y R. Crameri. 2008. Display of *E. coli* Alkaline Phosphatase pIII or pVIII Fusions on Phagemid Surfaces Reveals Monovalent Decoration with Active Molecules. *Open Biochem. J.*, 2: 38-43.
- Wengert, M., C. Berto, J. Kaufman, L.R. Leão-Ferreira, R. Paes-de-Carvalho, A.G. Lopes y C. Caruso-Neves. 2005. Stimulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase activity by adenosine A₂A receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 155–165.
- Whiteley, N.M., J.L. Scott, Breeze y L. McCann. 2001. Effects of water salinity on acid–base balance in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.*, 204: 1003-1011.
- Wieloch T. 1985. Trypsin activation of porcine procolipase Kinetics of activation and effects on lipid binding. *FEBS*, 185: 63-66.
- Williford A.L., L.M. Pare y G.T. Carlson. 2008. Bone mineral metabolism in the neonate: calcium, phosphorus, magnesium, and alkaline phosphatase. *Neonatal Netw.*, 27: 57-63.
- Xiao, R., L.-P. Xie, J.-Y. Lin, C.-H. Li, Q.-X. Chen, H.-M. Zhou, R.-Q. Zhang. 2002. Purification and enzymatic characterization of alkaline phosphatase from *Pinctada fucata*. *J. Mol. Catal. Enzym. B*, 17: 65–74.
- Xie, Z., y A. Askari. 2002. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.*, 269: 2434-2439.
- Yáñez-Ruiz, D.R., y E. Molina-Alcaide. A comparative study of nutrients utilization, alkaline phosphatase activity and creatinine concentration in the serum of sheep and goats fed diets based on olive leaves. *J. Anim. Physiol. An. Nutr.*, doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00719.x.
- Yi, S.-X., y T.S. Adams. 2002. Age- and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the intestine and malpighian tubules of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 46: 152-163.
- Zhu, C.-M., Q.-X. Chen, H.-N. Lin, Y. Yang y Y.-D. Park. 1999. Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by L-Cysteine. *J. Protein Chem.*, 18: 603-607.